



**Θ Ε Σ Σ Α Λ Ι Α Σ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Διευθυντής : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

**Διευθυντής ΠΜΣ : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**<< Επίδραση της χορήγησης συγκεντρώσεων 0.01nM και 0.1 nM  
Vitamin D στην κινητικότητα δειγμάτων σπέρματος>>**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΑΣΠΑΣΙΑ ΓΚΑΜΠΛΙΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ**

**Οκτώβριος 2017**

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής**  
**(Επιβλέπων)**      Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Αλέξανδρος Δαπόντε**  
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Χριστίνα Μεσσήνη**  
Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΜΥΑ) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας. Με την εργασία αυτή ολοκληρώνεται το στάδιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών, στο πρόγραμμα με τίτλο <<Βιολογία της Αναπαραγωγής>> της Σχολής Επιστημών Υγείας του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κρίνω λοιπόν σκόπιμο να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Αλέξανδρο Δαπόντε, Καθηγητή, Διευθυντή της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας, επικεφαλής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών <<Βιολογία της Αναπαραγωγής>> και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την ευκαιρία να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών και να εμβαθύνω τις μέχρι τώρα γνώσεις μου στους τομείς που αφορούν την Ανθρώπινη Αναπαραγωγή.

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων που επιμελήθηκε την διπλωματική αυτή εργασία, τον κύριο Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή, Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, ο οποίος με μύησε στον τρόπο σκέψης αλλά και στις πειραματικές τεχνικές που εφαρμόζονται στον τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η πολύτιμη καθοδήγηση του καθώς και η εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου με βοήθησαν να πραγματοποιήσω αυτά τα πειράματα και να ολοκληρώσω την εργασία μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τον κύριο Ανάργυρο Μουλά, Καθηγητή της Σχολής Τεχνολογίας και Γεωπονίας Τροφίμων και Διατροφής του ΤΕΙ Θεσσαλίας, ο οποίος μας προσέφερε την βιταμίνη για να μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε τα πειράματά μας. Για την βοήθεια της, τις χρήσιμες συμβουλές και το ενδιαφέρον να μας καθοδηγήσει στην παρούσα εργασία ευχαριστώ πολύ και την υποψήφιο διδάκτορα Μαρία Βαΐου.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της Μονάδας της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και στις συμφοιτήτριες μου Έλενα Σελιώνη, Άννα- Μαρία Δρίβα και Κωνσταντία Καλτσουνάκη για την άποψη συνεργασία μας και για την πολύτιμη βοήθεια

τους για την πραγματοποίηση όλων αυτών των μετρήσεων με σκοπό την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την μεγάλη στήριξη τους και την ενθάρρυνση τους για κάθε σημαντικό βήμα στην ζωή μου. Χάρη σε αυτούς μου δόθηκε η δυνατότητα να μπορέσω να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών.

Γκαμπλιά Βασιλική-Ασπασία

# **«Επίδραση της χορήγησης συγκεντρώσεων 0.01nM και 0.1nM Vitamin D στην κινητικότητα δειγμάτων σπέρματος»**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΑΣΠΑΣΙΑ ΓΚΑΜΠΛΙΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

*ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ*

*ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ*

*ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ*

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Επιβλέπων**      **Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής**  
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Σύμβουλος**      **Χριστίνα Μεσσήνη**  
Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μέλος**      **Αλέξανδρος Δαπόντε**  
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή με σημαντικές ιατρικές, ψυχολογικές και οικονομικές πτυχές. Ο ανδρικός παράγοντας είναι κατά το ήμισυ υπεύθυνος για το πρόβλημα της υπογονιμότητας που αντιμετωπίζουν πολλά ζευγάρια στην σημερινή εποχή. Η ανδρική υπογονιμότητα διαπιστώνεται με την λήψη ενός καλού ιστορικού, την κλινική εξέταση και την ανάλυση των παραμέτρων του σπέρματος. Μέχρι στιγμής δεν έχει ανακαλυφθεί κάποιος χρήσιμος παράγοντας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσει τις παραμέτρους του σπέρματος. Γίνονται όμως πολλές προσπάθειες για την εύρεση ενός τέτοιου παράγοντα και αυτό αποδεικνύεται από τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλά μόρια που εμπλέκονται στην φυσιολογία της αναπαραγωγής. Ένα τέτοιο μόριο που έχει απασχολήσει αρκετά τα μέλη της επιστημονικής κοινότητας, είναι ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D (1,25 διυδροξυβιταμίνη D), ο οποίος έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια και σχετίζεται με την φυσιολογία της αρσενικής αναπαραγωγής. Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) εκφράζεται στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια και η σύνδεση της ορμόνης σε αυτόν αυξάνει τα επίπεδα του ασβεστίου στο σπέρμα. Η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου είναι μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες της βιταμίνης καθώς επηρεάζει την κινητικότητα του σπέρματος. Τα ευρήματα από όλες τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, καθώς και η έλλειψη σχεδιασμένων *in vitro* μελετών για την επίδραση της έκθεσης του σπέρματος στον παράγοντα αυτόν, μας οδήγησε να σχεδιάσουμε την παρούσα μελέτη. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας τέθηκε η διερεύνηση της επίδρασης της βιταμίνης D στην κινητικότητα του σπέρματος μετά την προσθήκη δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων. Τα δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν από υπογόνιμα ζευγάρια που είχαν καταφύγει στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας και πραγματοποιήθηκαν σε αυτά διάφορες μετρήσεις μετά την κατάλληλη επεξεργασία του σπέρματος και με την προσθήκη της βιταμίνης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

## ABSTRACT

Infertility is a complicated disorder with important medical, psychological and economic aspects. The male factor is half responsible for the infertility problem that many couples face in these days. Male infertility is determined by obtaining a good history, clinical examination and sperm analysis. So far, has not been discovered a useful factor that can be used to improve semen parameters. However, many efforts are being made to find such a factor and this is evidenced by studies that have been carried out on many molecules which are involved in the physiology of reproduction. A molecule, which has been widely used by members of the scientific community, is the active metabolite of Vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D), which has been studied in recent years and has been shown to be related with the physiology of male reproduction. The Vitamin D receptor (VDR) is expressed in human spermatozoa and the binding of the hormone to the receptor activates him and increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The regulation of the calcium homeostasis is one of the most important properties of Vitamin, as it affects the motility of sperm. These research findings and the absent of scientific in vitro studies on the effect of sperm exposure to this factor led us to design this study. The purpose of this work was to investigate the effect of Vitamin D on sperm motility after adding two different concentrations of the Vitamin on the samples. The sperm sample has been collected from infertility couples in the Assisted Reproduction Unit of University Hospital of Thessaly and we took various measurements after the initiation of the experimental process and the exposure of sperm at different concentrations.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Υπογονιμότητα	9-10
1.1.1 Ανδρική υπογονιμότητα	10-11
1.1.2 Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	12
1.2 Βιταμίνη D και οι λειτουργίες της	13-14
1.2.1 Μεταβολισμός και δράση της βιταμίνης D	14-15
1.2.2 Τα φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης D	16
1.2.3 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης του ενεργού μεταβολίτη και η σύνδεση με τον υποδοχέα VDR	16-17
1.2.4 Βιταμίνη D και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα	18-23
1.3 Εκτίμηση σπέρματος	23
1.3.1 Λήψη δείγματος σπέρματος	24-25
1.3.2 Μακροσκοπική ανάλυση	25-26
1.3.3 Μικροσκοπική ανάλυση	26-27
1.3.4 Εκτίμηση της κινητικότητας	27-28
1.3.5 Αξιολόγηση του σπερμοδιαγράμματος	29-30
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32-33
2.1 Προετοιμασία της βιταμίνης	33-34
2.2 Προετοιμασία των δειγμάτων	34-36
2.3 Υλικά-Διαλύματα	36
3. ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Δημογραφικά στοιχεία εξεταζόμενων	38
3.2 Μελέτη της κινητικότητας των δειγμάτων με ή χωρίς την προσθήκη Βιταμίνης	39-45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46-49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50-53



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Υπογονιμότητα

Υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία σύλληψης μετά την παρέλευση ενός έτους σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη ή χρήση αντισυλληπτικών μέσων και εμφανίζεται στο 15% των ζευγαριών σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) . Τα τελευταία χρόνια μάλιστα εμφανίζεται σε ένα μεγάλο και διαρκώς αυξανόμενο αριθμό ζευγαριών παίρνοντας διαστάσεις σοβαρού κοινωνικού προβλήματος.

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Ως πρωτοπαθής υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται η αδυναμία ενός άτεκνου ζευγαριού να κάνει παιδιά για πρώτη φορά, ενώ ζευγάρια που έχουν ήδη συλλάβει στο παρελθόν και έχουν τεκνοποιήσει ή έχουν κάνει άμβλωση και αντιμετωπίζουν μεγάλη δυσκολία στο να επιτύχουν επόμενη κύηση, θεωρείται ότι έχουν δευτεροπαθή υπογονιμότητα.

Ο αριθμός των ζευγαριών που ζητούν ιατρική βοήθεια έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και υπολογίζεται πως πρόβλημα υπογονιμότητας αντιμετωπίζουν ένα στα τέσσερα νιόπαντρα ζευγάρια. Η επιτυχής αντιμετώπιση των προβλημάτων της γονιμότητας εξαρτάται από την ακριβή διάγνωση των αιτιών της υπογονιμότητας, η οποία επιτυγχάνεται με το λεπτομερές ιστορικό ,τη φυσική εξέταση του ζεύγους και τον κλινικό και εργαστηριακό έλεγχο. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αίτια της υπογονιμότητας οφείλονται τόσο στην γυναίκα όσο και στον άνδρα. Διεθνείς μελέτες έχουν δείξει ότι ένα ποσοστό 40% των περιστατικών οφείλεται στον γυναικείο παράγοντα, 40% στον ανδρικό παράγοντα και 20% οφείλεται σε συνδυασμό και των δύο (γυναικείας και ανδρικής προέλευσης) [B]. Επίσης σε ένα ποσοστό 10% δεν ανευρίσκεται κανένα αίτιο, που να θεωρείται υπεύθυνο για την υπογονιμότητα και τότε πρόκειται για ανεξήγητη υπογονιμότητα (όταν οι κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις είναι φυσιολογικές).

Στα συνήθη αίτια υπογονιμότητας περιλαμβάνονται:

- Διαταραχές στην ωοθυλακιορρηξία
- Πρόβλημα στις σάλπιγγες (απόφραξη, συμφύσεις)
- Αυξημένη ηλικία της γυναίκας
- Ενδομητρίωση
- Εχθρική συμπεριφορά της τραχηλικής βλέννας και παθήσεις του τραχήλου
- Παθήσεις της μήτρας
- Προβλήματα από το σπέρμα που αφορούν τον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων
- Παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση οινοπνεύματος, το εργασιακό περιβάλλον, το στρες [B]

### 1.1.1 Ανδρική υπογονιμότητα

Στον παρελθόν υπήρχε η αντίληψη ότι όταν ένα ζευγάρι είχε πρόβλημα τεκνοποίησης, υπεύθυνη για αυτό ήταν μόνο η γυναίκα. Σήμερα με βάση διάφορες στατιστικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι ο άνδρας είναι τουλάχιστον κατά το ήμισυ υπεύθυνος για την υπογονιμότητα του ζευγαριού. Για αυτό και θα πρέπει η αξιολόγηση των αρσενικών γαμετών και γενικότερα του άνδρα να πραγματοποιείται στον ίδιο βαθμό που αντιμετωπίζεται και η γυναίκα.

Ποικίλα είναι τα αίτια που μπορεί να προκαλέσουν διαταραχή στην διαδικασία της φυσιολογικής σπερματογένεσης ή εμπόδια στην φυσιολογική έξοδο του παραγόμενου σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση. Η διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας όπως και της γυναικείας δεν είναι μια απλή διαδικασία. Αρχικά θα πρέπει να ληφθεί ένα λεπτομερές ιστορικό για τυχόν παθήσεις στα γεννητικά όργανα ή και σε άλλα συστήματα καθώς επίσης και χειρουργικές επεμβάσεις που μπορεί να έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν. Εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και η καταγραφή λήψης φαρμάκων, κατανάλωσης οινοπνεύματος, η επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες και σε υψηλές θερμοκρασίες διότι αποτελούν παράγοντες που

επηρεάζουν την ποιότητα των σπερματοζωαρίων [8]. Την λήψη του ιστορικού ακολουθεί η φυσική εξέταση και η εξέταση του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO). Για την αρχική εκτίμηση του σπέρματος απαιτούνται δύο σπερμοδιαγράμματα σε χρονικό διάστημα μεταξύ αυτών από 7 ημέρες έως και 3 εβδομάδες. Αν τα αποτελέσματα των δύο εξετάσεων διαφέρουν σημαντικά, θα πρέπει να γίνει και τρίτο σπερμοδιάγραμμα. Εάν το σπερμοδιάγραμμα βρεθεί εντός φυσιολογικών ορίων η εξέταση του άνδρα δεν έχει καμία επιπρόσθετη αξία.

Η ανδρική υπογονιμότητα εκδηλώνεται με διαταραχές στον αριθμό, στην κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων [1]. Παρακολουθώντας τις παραμέτρους τους σπέρματος από το 1980 μέχρι και σήμερα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι υπάρχει όλο και μεγαλύτερη μείωση των φυσιολογικών ορίων των παραμέτρων όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO).

Cut-off reference values for semen characteristics as published in consecutive WHO manuals					
Semen characteristics	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010
Volume (mL)	ND	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 1.5
Sperm count (10 <sup>6</sup> /mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 15
Total sperm count (10 <sup>6</sup> )	ND	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 39
Total motility (%)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 40
Progressive motility	≥ 2	≥ 25%	≥ 25% (a)	≥ 25% (a)	≥ 32% (a+b)
Vitality (%)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	≥ 58
Morphology (%)	80.5	≥ 50	≥ 30	(14)*	≥ 4*
Leukocyte count (10 <sup>6</sup> /mL)	< 4.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0

Πίνακας 1: Τα φυσιολογικά όρια των παραμέτρων του σπέρματος

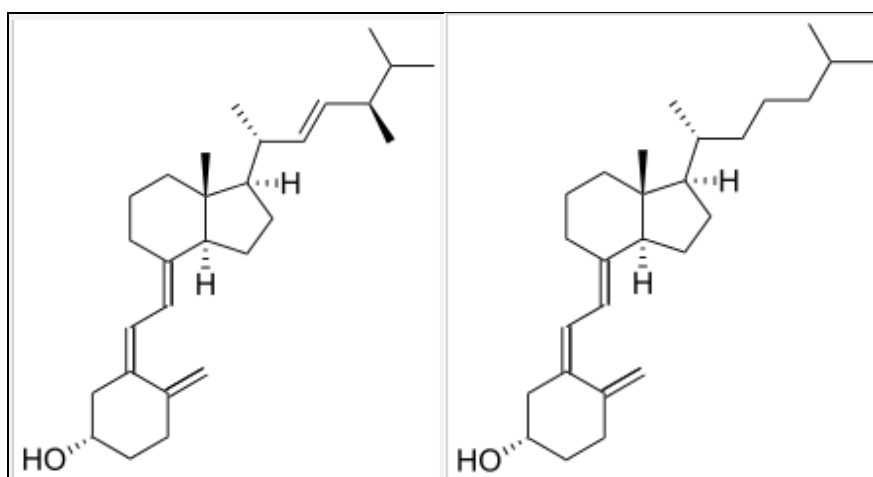
### 1.1.2 Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως πολλά μπορεί να είναι τα αίτια τα οποία μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στην σπερματογένεση και στην έξοδο του σπέρματος. Τα βασικότερα αίτια είναι τα εξής:

- Συγγενείς ανωμαλίες που μπορεί να σχετίζονται με αμφοτερόπλευρη ανυπαρξία των σπερματικών πόρων
- Φλεγμονές των γεννητικών οργάνων που μπορεί να προκαλέσουν ορχίτιδα, προστατίτιδα, επιδιδυμίτιδα
- Φλεγμονές των παραγεννητικών αδένων (προστάτης, σπερματοδόχες κύστεις) που μπορεί να διαταράξουν την ποιότητα του σπέρματος, μειώνοντας την κινητικότητα (ασθενοσπερμία) και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων (ολιγοζωοσπερμία)
- Ενδοκρινολογικές διαταραχές κατά τις οποίες η παραγωγή της τεστοστερόνης από τους όρχεις είναι ανεπαρκής έχουν ως αποτέλεσμα την διαταραχή της φυσιολογικής σπερματογένεσης. Η παραγωγή της τεστοστερόνης εξαρτάται από την ακεραιότητα του υποθαλάμου, της υπόφυσης και των κυττάρων Leydig
- Χρόνιες παθήσεις όπως η Κυστική Ίνωση, μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία πολλών οργάνων όπως το ήπαρ, το πάγκρεας και τους πνεύμονες
- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως το σύνδρομο Klinefelter
- Κιρσοκήλη
- Κρυπορχία
- Υποσπαδίας
- Επεμβάσεις ή τραυματισμοί στα γεννητικά όργανα
- Έκθεση σε τοξικές ουσίες, υψηλή θερμοκρασία, αλκοόλη, νικοτίνη και διάφορες φαρμακευτικές ουσίες
- Διαταραχές στην εκσπερμάτιση όπως για παράδειγμα απουσία εκσπερμάτισης, πρόωρη, καθυστερημένη, ασθενική, παλίνδρομη εκσπερμάτιση
- Νευρολογικά νοσήματα και ψυχολογικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την στυτική λειτουργία και την εκσπερμάτιση [1],[10],[B]

## 1.2 Βιταμίνη D και οι λειτουργίες της

Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία σχηματίζεται στον οργανισμό κυρίως μέσω της απορρόφησης της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας από το δέρμα, αλλά και από ορισμένες τροφές πλούσιες σε βιταμίνη D. Στην πραγματικότητα πρόκειται για ένα σύμπλεγμα βιταμινών D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub>, που είναι δύο λιποδιαλυτές αλκοόλες και σχηματίζονται από τις στερόλες που υπάρχουν στο ανθρώπινο δέρμα. Οι στερόλες αυτές είναι η προβιταμίνη 7-δευδροχοληστερόλη και η εργοστερόλη. Αφού οι δυο βιταμίνες σχηματιστούν με μια αντίδραση που πραγματοποιείται στο ήπαρ συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες [Α].



Εικόνα 1: Χημική δομή της εργοστερόλης και της δευδροχοληστερόλης

Ο πρωταρχικός φυσιολογικός ρόλος της βιταμίνης D αφορά τον μεταβολισμό του ασβεστίου, όπου συμμετέχει στη διατήρηση της σταθερότητας των εξωκυττάριων και ενδοκυττάριων συγκεντρώσεων του ασβεστίου και του φωσφόρου. Η βιταμίνη D ρυθμίζει τα επίπεδα ασβεστίου και φωσφόρου στο αίμα προάγοντας την απορρόφησή τους από την τροφή στο έντερο και προάγοντας την επαναρρόφηση του ασβεστίου στα νεφρά [28]. Αυτό επιτρέπει την φυσιολογική πρόσληψη του ασβεστίου στα οστά, που είναι αναγκαίο για την ανάπτυξη και την ανάπλασή τους. Ακόμη, η βιταμίνη D προάγει

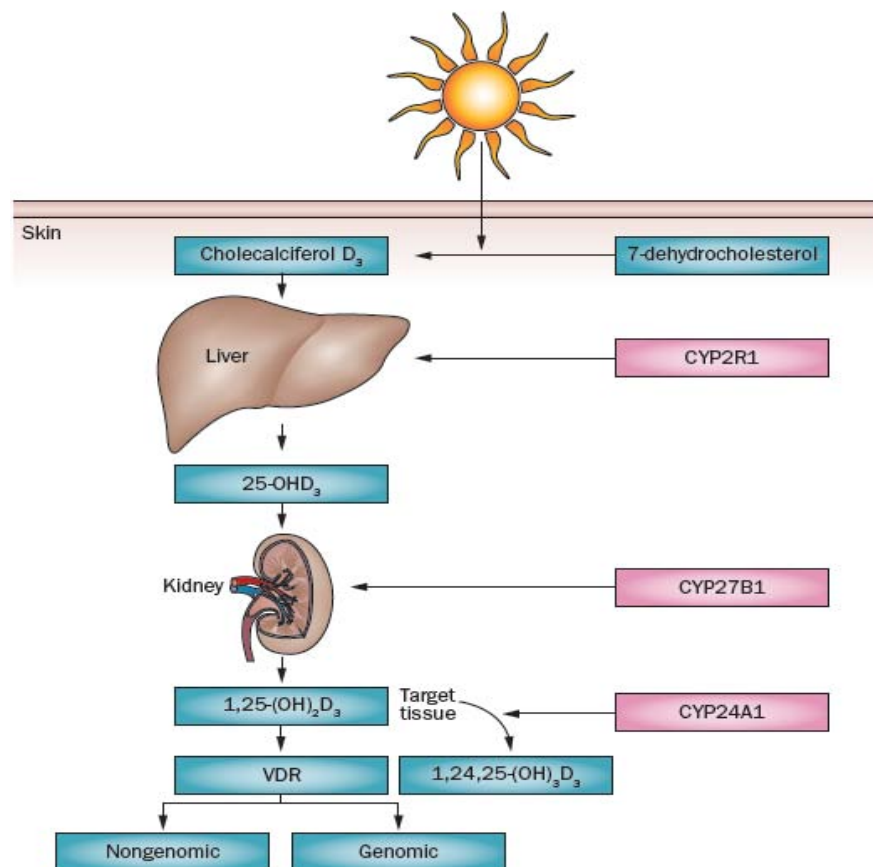
τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος με την αύξηση της φαγοκυττάρωσης, την αντικαρκινική δράση και άλλες ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες. Η βιταμίνη D είναι μια ορμόνη με άμεση επίδραση στα γονίδια μας.

Η έλλειψη της βιταμίνης D μπορεί να προκύψει από ανεπαρκή διαιτητική πρόσληψη, από ανεπαρκή έκθεση στο ηλιακό φως, από σύνδρομο δυσαπορρόφησης, από ηπατικές ή νεφρικές διαταραχές ή από κληρονομικές μεταβολικές διαταραχές. Η έλλειψή της προκαλεί μειωμένη εναπόθεση ασβεστίου στα οστά και οδηγεί σε νοσήματα των οστών όπως ραχίτιδα [28]. Αρκετές πρόσφατες μελέτες δείχνουν την ευεργετική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης της βιταμίνης και της πρόληψης διαφόρων μορφών καρκίνου όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου.

### 1.2.1 Μεταβολισμός και δράση της βιταμίνης D

Η βιταμίνη D είναι μια οργανική ουσία και ανήκει και στις βιταμίνες και στις ορμόνες. Οι δύο μορφές (μεταβολίτες) της βιταμίνης D είναι η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D<sub>2</sub>) η οποία περιλαμβάνεται στις τροφές και η χοληκαλσιφερόλη (ανενεργή βιταμίνη D<sub>3</sub>) η οποία παράγεται στο δέρμα μέσω της έκθεσης του από την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου. Επειδή μόνο τα ψάρια είναι πλούσια σε βιταμίνη D, το μεγαλύτερο μέρος της λαμβανόμενης βιταμίνης D<sub>2</sub> στις βιομηχανοποιημένες κοινωνίες προέρχεται από εμπλουτισμένα προϊόντα όπως το γάλα, το γάλα σόγιας, τα δημητριακά και συμπληρώματα διατροφής. Η βιταμίνη D<sub>3</sub> παράγεται στο δέρμα όταν εκτίθεται στο ηλιακό φως και πιο συγκεκριμένα από την υπεριώδη ακτινοβολία B (UVB). Η 7-δευδροχοληστερόλη αντιδρά με την υπεριώδη ακτινοβολία B σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (270-300nm) για να παράγει την προβιταμίνη D [5],[9]. Στην πραγματικότητα όμως δεν πρόκειται για βιταμίνη αλλά για μία προ-στεροειδή ορμόνη, η οποία έχει άμεση δράση στα γονίδια μας. Η προβιταμίνη D<sub>3</sub> μετατρέπεται ταχύτατα με ισομερισμό των διπλών δεσμών της σε βιταμίνη D<sub>3</sub>. Μετά την παραγωγή της βιταμίνης είτε από το δέρμα είτε από την πρόσληψη της από τα τρόφιμα αυτήν μετατρέπεται στους νεφρούς και στο ήπαρ στην δραστική της μορφή την 1,25- διυδροξυβιταμίνη D (1,25{OH}<sub>2</sub> D). Για τον σχηματισμό της 1,25- διυδροξυβιταμίνης D (1,25{OH}<sub>2</sub> D) απαιτούνται δύο

διαδοχικές αντιδράσεις υδροξυλίωσης. Η πρώτη αντίδραση πραγματοποιείται στο ήπαρ από το ηπατικό ένζυμο 25- υδροξυλάση (CYP2R1) για τον σχηματισμό της 25-υδροξυβιταμίνης D {25(OH)D<sub>3</sub>} και η δεύτερη αντίδραση στη συνέχεια πραγματοποιείται στο νεφρό από το νεφρικό ένζυμο 1α-υδροξυλάση (CYP27B1) για τον σχηματισμό της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D (1,25(OH)<sub>2</sub> D) [5],[7],[22]. Μετά από την μετατροπή της στην δραστική μορφή η βιταμίνη απελευθερώνεται στην κυκλοφορία για να δράσει στους διάφορους ιστούς που διαθέτουν τους υποδοχείς της [2]. Το τελικό προϊόν του μεταβολισμού της, η Καλσιτριόλη (1,25-dihydroxyvitamin D), είναι μια σεκοστεροειδής ορμόνη που αλληλεπιδρά με περισσότερα από 2,500 γονίδια στο ανθρώπινο σώμα [3]. Η καλσιτριόλη συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στον υποδοχέα της έως ότου απενεργοποιηθεί από το ένζυμο CYP24A1. Κατά την δέσμευσή της στον υποδοχέα ασκεί τόσο γονιδιωματικές όσο και μη γονιδιωματικές λειτουργίες [2],[7],[20].



Εικόνα 2: Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D

### 1.2.2 Τα φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης D

Ο όρος βιταμίνη D περιλαμβάνει όλες τις μορφές της βιταμίνης, δηλαδή τη βιταμίνη D<sub>2</sub> και τη βιταμίνη D<sub>3</sub>. Ωστόσο κλινικής σημασίας είναι η βιταμίνη D<sub>3</sub>, της οποίας εκτιμώνται οι συγκεντρώσεις στο σώμα, μετρώντας στον ορό του αίματος τις συγκεντρώσεις της ολικής βιταμίνης D δηλαδή της 25- υδροξυβιταμίνης D (25-OH vitamin D). Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η παραγωγή της βιταμίνης D<sub>3</sub> επιτυγχάνεται με την έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία B (UVB) της ηλιακής ακτινοβολίας. Άλλες πηγές βιταμίνης D<sub>3</sub> είναι μερικές φυσικές τροφές (π.χ. τα λιπαρά ψάρια), οι τροφές που έχουν ενισχυθεί με μικρές ποσότητες βιταμίνης D<sub>3</sub> ή D<sub>2</sub> (γάλα, βούτυρο, μαργαρίνη) και τα συμπληρώματα βιταμίνης D<sub>3</sub>, που χορηγούνται από το στόμα. Ένα άτομο θεωρείται ότι έχει φυσιολογικά επίπεδα βιταμίνης D<sub>3</sub>, όταν τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της 25-υδροξυβιταμίνης D (25-OH vitamin D) κυμαίνονται από 30ng/ml έως 100ng/ml. Οι διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τα επίπεδα της βιταμίνης, έχουν δημιουργήσει κάποιες κατηγορίες που αντιπροσωπεύουν την κατάταξη με βάση τα φυσιολογικά επίπεδά της στον ορό. Αυτές οι κατηγορίες που έχουν ταξινομηθεί είναι οι ακόλουθες:

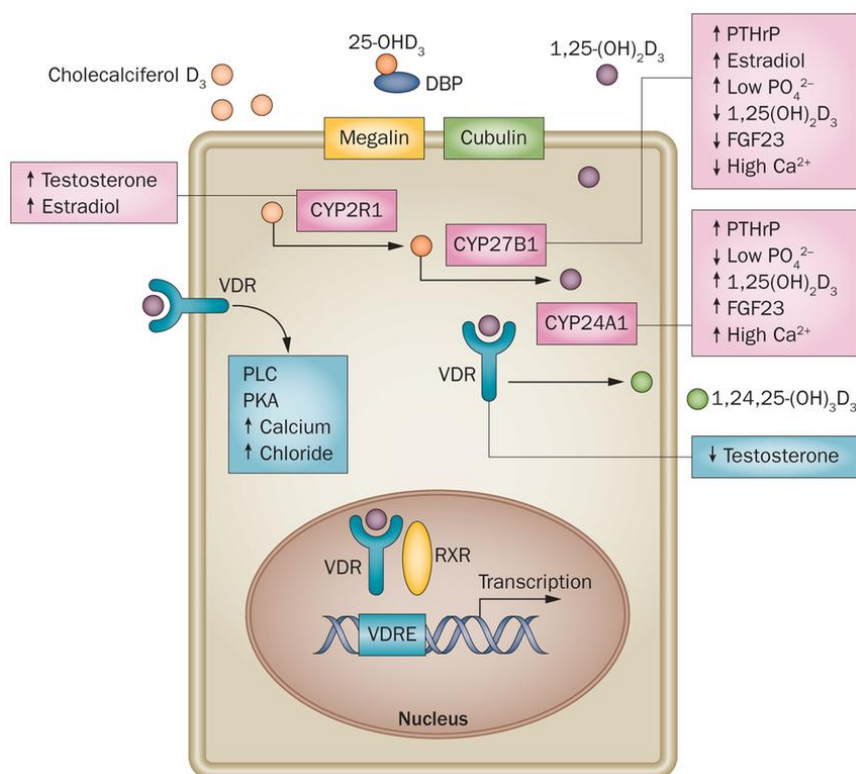
- Έλλειψη βιταμίνης D <25 nmol / L (<10 ng / mL)
- Ανεπάρκεια της βιταμίνης D 25-75 nmol / L (10-30 ng / mL)
- Επάρκεια της βιταμίνης D 75- 250 nmol / L (30-100 ng / mL)
- Τοξικότητα της βιταμίνης D > 250 nmol / L (> 100 ng / mL) [18]

### 1.2.3. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης του ενεργού μεταβολίτη και η σύνδεση του στον υποδοχέα VDR

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) εντοπίζεται στον πυρήνα και είναι ομόλογος με υποδοχείς άλλων στεροειδών ορμονών. Ο VDR είναι μέλος της οικογένειας των θυροειδικών και ρετινοειδικών υποδοχέων [2],[3],[7]. Αποτελείται από ένα τμήμα που συνδέεται με το DNA (DNA binding domain) και ένα τμήμα που δεσμεύει τον συνδέτη



(ligand binding domain) καθώς και από άλλα τμήματα. Δρα ως μεταγραφικός παράγοντας μετά την πρόσδεση του συνδέτη δηλαδή την καλσιτριόλη (την ορμόνη  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) και ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων [2],[3]. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν ρόλο στη ρύθμιση, στη διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι ακολουθίες του DNA στα γονίδια στόχους ονομάζονται στοιχεία ανταπόκρισης της βιταμίνης D (response elements VDREs). Τα VDREs βρίσκονται σε περιοχές προωθητών μεταγραφής γονιδίων που ελέγχουν την ομοιοστάση του ασβεστίου καθώς και των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της βιταμίνης D. Πριν συνδεθεί ο VDR με τα VDREs προηγείται ο ετεροδιμερισμός του σε μία ή και περισσότερες ισομορφές του υποδοχέα του ρετινοϊκού (Retinoid X Receptor, RXR)<sub>[7]</sub>. Στη συνέχεια η σύνδεση της βιταμίνης με τον υποδοχέα (VDR) τον ενεργοποιεί και προκαλεί την φωσφορυλίωσή του με συνέπεια την αλλαγή στην διαμόρφωσή του που ακολουθεί έναν καταρράκτη γεγονότων με σκοπό την μεταγραφή των γονιδίων [7],[9].



Εικόνα 3: Η κυτταρική απόκριση μετά την σύνδεση της βιταμίνης στον υποδοχέα VDR και οι παράγοντες που επηρεάζουν το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

### 1.2.2 Βιταμίνη D και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

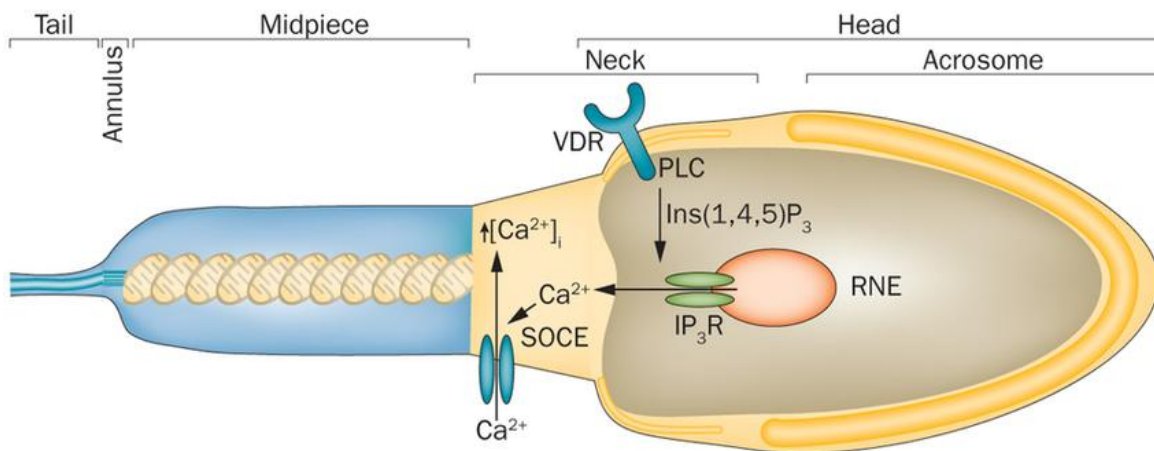
Υπολογίζεται πως το 10-15% των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, δεν καταφέρνουν να επιτύχουν εγκυμοσύνη μέσα στους 12 μήνες ελεύθερων σεξουαλικών επαφών και ευθύνη για αυτό φέρουν και τα δύο φύλα σε αντίθεση με αντιλήψεις του παρελθόντος που η υπογονιμότητα αποδίδονταν μόνο στον γυναικείο παράγοντα. Σήμερα η γονιμότητα των αρρένων αξιολογείται με την ανάλυση του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) αλλά δεν έχει ανακαλυφθεί καμία θεραπεία που να βελτιώνει τις παραμέτρους αυτού.

Η βιταμίνη D είναι ένα ευέλικτο μόριο σηματοδότησης με καλά εδραιωμένο ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) και της υγείας των οστών. Το  $\text{Ca}^{2+}$  όπως γνωρίζουμε είναι πολύ σημαντικό μόριο το οποίο εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες της αρσενικής αναπαραγωγικής οδού όπως για παράδειγμα στην σπερματογένεση, στην κινητικότητα του σπέρματος και στην ακροσωμική αντίδραση [2],[3],[6],[25].

Η βιταμίνη D είναι μια ορμόνη που έχει άμεση επίδραση στα γονίδια μας και πέραν από τις φυσιολογικές λειτουργίες εμπλέκεται και στην αναπαραγωγή. Ερευνητές του Πανεπιστημίου του Γκρατς στην Αυστρία (European Journal of Endocrinology) τόνισαν ότι η βιταμίνη D αποτελεί <<κλειδί>> σε ότι αφορά την ορμονική ισορροπία στις γυναίκες αλλά και στην αύξηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων στους άνδρες. Στις γυναίκες η αύξηση της βιταμίνης αυξάνει τα επίπεδα των οιστρογόνων κατά 21% και της προγεστερόνης κατά 13% ρυθμίζοντας τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και αυξάνοντας τις πιθανότητες σύλληψης. Στους άνδρες η αποκαλούμενη και ως βιταμίνη του ηλίου, καθώς ο κύριος τρόπος σύνθεσής της είναι η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, είναι ζωτικής σημασίας για την σωστή λειτουργία των σπερματοζωαρίων και την αύξηση των επιπέδων της ανδρικής ορμόνης τεστοστερόνης [7]. Μελέτες τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και στους ανθρώπους αποδεικνύουν ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης εμπλέκεται τόσο στην ανδρική όσο και στην γυναικεία στειρότητα [5],[9],[15]. Τα παραπάνω δεδομένα και δεδομένου του προβλήματος της υπογονιμότητας που αντιμετωπίζουν πολλά ζευγάρια στην σημερινή εποχή έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών στην μελέτη αυτού του μορίου και τον πιθανό ρόλο του στην αναπαραγωγική φυσιολογία [3].

Σε πρόσφατες μελέτες αποδείχθηκε ο εντοπισμός του υποδοχέα της βιταμίνης D καθώς και των ενζύμων που την μεταβολίζουν στον ανθρώπινο εκσπερματικό πόρο (ejaculatory duct), στους όρχεις, στον προστάτη, στην επιδιδυμίδα και στα ώριμα σπερματοζωάρια [3],[5]. Ακόμη η βιταμίνη D δεν είναι σημαντική μόνο στην ενηλικίωση καθώς ο υποδοχέας της VDR εκφράζεται και στα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα (Sertoli,Leydig) [2],[8]. Η έκφρασή του στα κύτταρα αυτά υποδηλώνει ότι η βιταμίνη μπορεί να επηρεάζει την παραγωγή των αναπαραγωγικών ορμονών των αρρένων [5]. Εντούτοις, η επίδραση της βιταμίνης D στην παραγωγή των ορμονών είναι ανεξερεύνητη, αν και πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια που τους έχει αφαιρεθεί ο υποδοχέας, έχουν δείξει ότι τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων λόγω χαμηλής δραστηριότητας της αρωματάσης [7],[15]. Τα οιστρογόνα είναι σημαντικά για την επαναρρόφηση του νερού κατά την διέλευση του σπέρματος από τον όρχι στην επιδιδυμίδα και τα χαμηλά επίπεδα των οιστρογόνων μπορεί να μεταβάλλουν την οσμωτικότητα και αυτήν να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των σπερματοζωαρίων [13].

Στον άνθρωπο ο υποδοχέας της βιταμίνης D και όλα τα ένζυμα του μεταβολισμού της βιταμίνης συνεκφράζονται στα τελευταία στάδια της σπερματογένεσης και βρέθηκε να εντοπίζονται ομοιόμορφα στον πυρήνα του σπέρματος και μερικά σωματίδια εντοπίστηκαν διασκορπισμένα και στον αυχένα του σπέρματος [2],[15]. Ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D συνδέεται με τον υποδοχέα VDR στην περιοχή του αυχένα του σπερματοζωαρίου και προκαλεί την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) και την επακόλουθη παραγωγή της τριφωσφορικής ινοσιτόλης IP3 [2]. Στη συνέχεια η τριφωσφορική ινοσιτόλη συνδέεται στους υποδοχείς της και επάγει την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου από μια ενδοκυτταρική αποθήκη που βρίσκεται στον αυχένα των σπερματοζωαρίων. Αυτήν η διαμεσολαβούμενη μη γονιδιωματική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μέσω του υποδοχέα της βιταμίνης D προκαλεί την αύξηση της κινητικότητας, την επιβίωση του σπέρματος και την επακόλουθη ακροσωμική αντίδραση που απαιτείται για την σύντηξή του με το ωάριο [8].



Εικόνα 4: Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) επάγει την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες

Η κυτταρική απόκριση στην βιταμίνη είναι περίπλοκη, δεδομένου ότι δεν εξαρτάται μόνο από την έκφραση του υποδοχέα VDR αλλά και από την πρόσληψη της κυκλοφορούσας βιταμίνης και την παρουσία και την δραστηριότητα των ενζύμων που την μετατρέπουν στον ενεργό μεταβολίτη [5],[7],[22]. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα ένζυμα του μεταβολισμού της βιταμίνης είναι παρόντα σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων και των οργάνων του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος [3],[5]. Μόνο ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D δηλαδή η 1,25- διυδροξυβιταμίνη D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ ) μπορεί να συνδεθεί με υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα και συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η ικανότητα αυτών των ενζύμων να συνδέονται στο υπόστρωμα και να το μεταβολίζουν [11]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη και το γεγονός ότι σε μια έρευνα που έγινε, η έκφραση του υποδοχέα καθώς και του ενζύμου CYP24A1 που έχει την ιδιότητα να απενεργοποιεί τον ενεργό μεταβολίτη, είναι υψηλότερη στα σπερματοζωάρια των γόνιμων ανδρών από ότι των υπογόνιμων [5],[7]. Πιθανώς η παρουσία της 1,25- διυδροξυβιταμίνης D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ ) και η σύνδεση της με τον υποδοχέα να ελέγχεται από ένα αυτοκρινές σύστημα αλληλορύθμισης που ελέγχει τα επίπεδα της βιταμίνης καθώς και την απελευθέρωση στο ασβεστίου [3].

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι οι άνδρες με επίπεδα ορού της βιταμίνης μεταξύ 50-125 nmol/l είχαν αυξημένη κινητικότητα του σπέρματος σε σχέση με τους άνδρες που τα επίπεδα της βιταμίνης στο ορό ήταν <50 nmol/l ή >125 nmol/l [6],[24]. Πρόσφατες μελέτες

έχουν δείξει πως η χορήγηση της βιταμίνης D μπορεί να είναι ευεργετική σε ζευγάρια τα οποία υποβάλλονται στις τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως και τα υψηλά επίπεδα της βιταμίνης στο ορό σχετίστηκαν με υψηλότερες πιθανότητες σύλληψης.

Η επαγόμενη από την βιταμίνη D αύξηση του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) στα σπερματοζωάρια και η λειτουργία αποθήκευσης του ασβεστίου στον αυχένα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων υποδηλώνει ότι η βιταμίνη εμπλέκεται στην κινητικότητα κάτι το οποίο υποστηρίζεται από αρκετές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα [4]. Αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα έχουν δείξει ότι η βιταμίνη D μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπέρματος και την γονιμότητα (Πίνακας 2). Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που τους έχει αφαιρεθεί ο υποδοχέας της βιταμίνης (knockout) και ποντίκια φυσιολογικά που όμως εκτρέφονται χωρίς επαρκή ποσότητα της βιταμίνης D τείνουν να έχουν μειωμένη γονιμότητα, χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων και λιγότερο κινητικό σπέρμα [5],[14],[15]. Η μειωμένη αναπαραγωγική επίδοση που προκαλείται από την ανεπάρκεια της βιταμίνης D και οφείλεται στην ανισορροπία του ασβεστίου είναι αναστρέψιμη και μπορεί να διορθωθεί είτε με την παροχή της βιταμίνης D είτε με την ομαλοποίηση των επιπέδων του ασβεστίου [5],[23]. Σε μια άλλη έρευνα αρσενικοί αρουραίοι με ανεπάρκεια στην βιταμίνη D είχαν μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων και θηλυκοί αρουραίοι που γονιμοποιήθηκαν από το σπέρμα των αρσενικών αρουραίων είχαν 73% λιγότερες κυήσεις σε σύγκριση με θηλυκούς αρουραίους που είχαν γονιμοποιηθεί με σπέρμα από αρσενικούς αρουραίους με επάρκεια στην βιταμίνη D [5],[14]. Η βιταμίνη D είναι ρυθμιστής της περιεκτικότητας του ενδοκυτταρικού ασβεστίου στα ώριμα σπερματοζωάρια το οποίο υποστηρίζεται και από μια μελέτη που δείχνει ότι η επίδραση της βιταμίνης στα σπερματοζωάρια μπορεί να μειωθεί με τον αποκλεισμό των διαύλων του ασβεστίου [19].

Study Design	Animals	Fertility	Sperm morphology	Rescued reproductive phenotype	Reference
Vitamin D deficient rodents	Sprague Dawley rats	↓	NA	Reversible by vitamin D, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , and calcium. Conclusion limited by study design.	Kwiecinski et al. [42] Uhland et al. [44]
VDR KO	C57BL/6 or Swiss mice	↓	No change or abnormal	Hypogonadism rescued with calcium and testis histology reversed following supplementation with calcium and estradiol.	Yoshizawa et al. [40] Li et al. [70] Kinuta et al. [41] Blomberg et al. [43] Erben et al. [71]
$1\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) KO	BALB/C mice	↓	Abnormal	Rescued by calcium or phosphate.	Panda et al. [72] Sun et al. [73]

Πίνακας 2: Μελέτες που αποδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της ανεπάρκειας της βιταμίνης D και της υπογονιμότητας σε διάφορα ζωικά μοντέλα

Η σχέση μεταξύ των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό και την ποιότητα του σπέρματος έχει αξιολογηθεί σε πολλές ανθρώπινες μελέτες που συνοψίζονται στον Πίνακα 3. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 300 νέους και υγιείς Δανούς άνδρες έδειξε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων της βιταμίνης και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων [6]. Μια μικρή μελέτη 147 ατόμων ανακάλυψε ότι υπάρχει μια τάση για αύξηση της κινητικότητας στους άνδρες που τα επίπεδα της βιταμίνης ήταν μεταξύ 50-125 nM σε σύγκριση με αυτούς που είχαν ανεπαρκή <50 nM ή υψηλά επίπεδα >125 nM της βιταμίνης [12]. Το κοινό πρόβλημα όλων των ανθρώπινων μελετών που διεξάγονται είναι ότι οι άνδρες με ανεπαρκή ποσότητα της βιταμίνης D στον ορό είναι πολύ λίγοι. Σχεδόν όλες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί διερευνούν τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της  $1,25$ -διυδροξυβιταμίνης D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) στον ορό με τις εξής παραμέτρους του σπέρματος: κινητικότητα, αριθμό σπερματοζωαρίων, μορφολογία ενώ λίγες είναι οι μελέτες μέχρι σήμερα που εξετάζουν την επίδραση της βιταμίνης *in vitro* στην κινητικότητα του σπέρματος [3] όπως επίσης και στην επιτυχή σύλληψη. Τέλος, μια έρευνα που διεξήχθη με σκοπό την μελέτη της επιτυχούς σύλληψης σε ανθρώπους που ζουν στις βόρειες χώρες έδειξε ότι έχουν χαμηλότερα ποσοστά σύλληψης τους χειμερινούς μήνες, τα οποία οφείλονται στα μειωμένα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό κατά την διάρκεια του χειμώνα [21].

No.	Design	n	Age	Cohort	BMI	Sperm motility	Sperm morphology	Sperm count	25-OHD <50 nM (%)	Fertility	Comment	Reference
1	Association	307	20	Healthy	23	↑	↓	↓	30%	-	Few men with low vitamin D unadjusted Motility; $p=0.06$	Ramlau-Hansen et al. [46]
2	Association	300	19	Healthy	23	↑	↑	→	44%	-	Morphology borderline	Blomberg Jensen et al. [37]
3	Association	195	31	Fertile and infertile	24	↑	→	-	-	-	Motility and morphology borderline	Yang et al. [45]
4	Association	70	33	Fertile and infertile	-	↑	→	→	-	-	Motility borderline	Blomberg Jensen et al. [34]
5	Association	147	29	Healthy	24	↑	→	↑	<13%	-	Few men with low vitamin D	Hammoud et al. [74]
6	Association	1182	34	Infertile	26	↑	→	↑	40%	-		Blomberg Jensen et al. [51]
7	Pilot study	90	35	Infertile couples	24	→	-	→	>40%	↑	More successful conceptions	Tartagni et al. [47]
8	Pilot study	86		Infertile		(↑)	-	(↑)	-	↑	In Chinese. Total number of progressive motile spermatozoa increased	Deng et al. [48]
9	Pilot study	52	34	Healthy	-	→	-	-	50%	-	Sperm motility increased	Waud et al. [75]

Πίνακας 3: Ανθρώπινες μελέτες οι οποίες διερευνούν τη σχέση μεταξύ των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό και την ποιότητα του σπέρματος

### 1.3. Εκτίμηση σπέρματος

Για τη διερεύνηση κάποιου υπογόνιμου άνδρα, μετά τη λήψη του ιστορικού και τη φυσική εξέταση, ακολουθεί ο εργαστηριακός έλεγχος. Η σημαντικότερη εργαστηριακή εξέταση είναι η ανάλυση του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) με βάση τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO). Εάν η εξέταση σπέρματος αποδειχθεί φυσιολογική, δεν είναι απαραίτητο να επαναληφθεί, εάν όμως δεν είναι φυσιολογική κρίνεται απαραίτητο να επαναληφθεί μετά από διάστημα 6-12 εβδομάδων. Η ανάλυση και η εκτίμηση των παραμέτρων του σπέρματος δεν είναι ιδιαίτερα εύκολη καθώς οι παράμετροι μπορεί να παρουσιάζουν διακυμάνσεις με τη λήψη δειγμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο τουλάχιστον σπερμοδιαγράμματα στο διάστημα που αναφέρθηκε παραπάνω και όχι νωρίτερα από 4 εβδομάδες. Ωστόσο η ανάλυση αυτήν δεν μπορεί να αποδείξει ή να ποσοτικοποιήσει τη γονιμότητα ενός άνδρα. Φυσικά, όταν τα χαρακτηριστικά του σπέρματος, και ειδικότερα των σπερματοζωαρίων, δεν πλησιάζουν τις τιμές αναφοράς, οι πιθανότητες για σύλληψη αν και δεν μηδενίζονται, μειώνονται σημαντικά.

### 1.3.1 Λήψη δείγματος σπέρματος

Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης το σπέρμα παράγεται από ένα συμπυκνωμένο αιώρημα σπερματοζωαρίων που είναι αποθηκευμένο στην επιδιδυμίδα και αραιωμένο με τις υγρές εκκρίσεις από τα επικουρικά γεννητικά όργανα (προστάτης, σπερματοδόχες κύστεις). Ο αδένας του προστάτη και οι σπερματοδόχες κύστεις εκκρίνουν την πλειονότητα εκείνου του υγρού το οποίο υποστηρίζει τα εκσπερματούμενα κύτταρα.

Ο τρόπος λήψης του σπέρματος είναι ιδιαίτερα σημαντικός έτσι ώστε το σπέρμα να αξιολογηθεί σωστά και να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία του. Για να διατηρήσει το σπέρμα τα χαρακτηριστικά του και τις πλήρεις γονιμοποιητικές του δυνατότητες χωρίς επιμολύνσεις ή απώλειες θα πρέπει να ακολουθούνται κατά γράμμα οι οδηγίες που δίνονται από το εκάστοτε ανδρολογικό εργαστήριο. Το δείγμα συλλέγεται το ελάχιστο μετά από 48 ώρες και ποτέ περισσότερο από 7 ημέρες αποχής. Θα πρέπει να σημειώνεται το όνομα του ανδρός, οι ημέρες αποχής καθώς και η ώρα συλλογής του δείγματος. Για να υπάρχει αξιόπιστο αποτέλεσμα στην εκτίμηση της συγκέντρωσης και της κινητικότητας θα πρέπει να καθορίζεται με ακρίβεια το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας εκσπερμάτισης και της συλλογής δείγματος. Διότι όταν η αποχή ξεπεράσει τις 7 ημέρες τα σπερματοζωάρια με ταχεία κίνηση μειώνονται και ο όγκος αυξάνεται ενώ όταν η αποχή είναι μικρότερη από 48 ώρες μπορεί η κινητικότητα να μην μειωθεί αλλά η συγκέντρωση μειώνεται κατακόρυφα.

Η συλλογή του δείγματος θα πρέπει να γίνεται με αυνανισμό σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο κοντά στο εργαστήριο, μέσα σε πλαστικό ή γυάλινο δοχείο-συλλέκτη στο οποίο όπως αναφέρθηκε και παραπάνω θα αναγράφεται το όνομα του εξεταζόμενου. Εάν η συλλογή πραγματοποιείται σε πλαστικό δοχείο-συλλέκτη (ourobex) τότε θα πρέπει να εξετάζεται για την παρουσία ή έλλειψη τοξικών επιδράσεων στα σπερματοζωάρια. Το δείγμα πρέπει απαραίτητως να συλλέγεται ολόκληρο για να μην χαθεί το πρώτο κλάσμα που περιέχει τα προστατικά εκκρίματα και στο οποίο θεωρείται ότι τα σπερματοζωάρια έχουν καλύτερη γονιμοποιητική ικανότητα σε σχέση με το δεύτερο κλάσμα όπου περιλαμβάνει εκκρίσεις κυρίως από τις σπερματοδόχες κύστεις. Ακολούθως το δοχείο-συλλέκτης θα πρέπει να φυλάσσεται σε μέρος με σταθερή



θερμοκρασία 20-37°C μέχρι την ανάλυσή του. Σε περίπτωση αδυναμίας λήψης δείγματος στην μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ο εξεταζόμενος μπορεί να συλλέξει το δείγμα με αυνανισμό στο σπίτι ακολουθώντας τις αντίστοιχες οδηγίες και μεταφέροντας το άμεσα στο εργαστήριο. Στην συνέχεια πραγματοποιείται πρώτα η μακροσκοπική και έπειτα η μικροσκοπική εξέταση του δείγματος με βάση το εγχειρίδιο του WHO (2010) για την εξέταση και την επεξεργασία του ανθρώπινου σπέρματος [26].

### 1.3.2 Μακροσκοπική ανάλυση

Το σπέρμα μετά την εκσπερμάτιση συλλέγεται με τη μορφή θρόμβων οπότε προκειμένου να εξεταστεί θα πρέπει να ρευστοποιηθεί. Τα ένζυμα που προκαλούν την πήξη εκκρίνονται από τις σπερματοδόχους κύστες, ενώ η πρωτεΐνάση που εκκρίνεται από τον προστάτη συντελεί στη ρευστοποίησή του. Κάθε δείγμα σπέρματος θα πρέπει να ελέγχεται μετά τη ρευστοποίησή του. Ο φυσιολογικός χρόνος ρευστοποίησης σε θερμοκρασία δωματίου είναι λιγότερος ή ίσος με 60 λεπτά (αν και συνήθως η ρευστοποίηση ολοκληρώνεται σε περίπου 15 λεπτά). Η εκτίμηση θα πρέπει να συμβαίνει πάντοτε εντός μια ώρας για να αποφεύγονται η αφυδάτωση και οι αλλαγές της θερμοκρασίας.

Το μίγμα των τελικών εκκρίσεων, της εκσπερμάτισης, είναι ένα ομοιογενές υγρό με γαλακτώδη σύσταση και λευκωπό αδιαφανές χρώμα. Στην περίπτωση που η συγκέντρωσή του είναι ιδιαίτερα χαμηλή, όπως μετά από συχνή σεξουαλική δραστηριότητα, το χρώμα του είναι περισσότερο διαφανές, ενώ είναι δυνατό να εμφανίζει καφεοειδές χρώμα, εξαιτίας της ύπαρξης ερυθροκυττάρων (αιμοσπερμία). Το κίτρινο χρώμα υποδεικνύει πιθανή έλλειψη βιταμινών ή ίκτερο. Η οσμή του φυσιολογικού σπέρματος περιγράφεται ως παρόμοια με αυτή του βρασμένου κάστανου. Όταν όμως παρατηρείται ατροφία του προστάτη, η οσμή αυτή απουσιάζει, ενώ σε περιπτώσεις φλεγμονής του, υπάρχει χαρακτηριστική δυσοσμία.

Ο όγκος της εκσπερμάτισης, μετά από περίοδο αποχής τουλάχιστον 2 ημερών, φυσιολογικώς είναι μεγαλύτερος από 2 ml. Το 60% περίπου του όγκου του σπέρματος

προέρχεται από τις σπερματοδόχους κύστες και το 30% από τον προστάτη. Η μέτρηση του όγκου γίνεται με βαθμονομημένες πιπέτες και αποφεύγεται η χρήση των πλαστικών συριγγών ή πιπετών γιατί δεν αναρροφάται όλο το δείγμα και επομένως δεν εκτιμάται σωστά.

Η εκτίμηση του ιξώδους γίνεται με αναρρόφηση του σπέρματος σε πιπέτα όγκου 5ml, όπου το δείγμα αφήνεται να πέσει με τη βοήθεια της βαρύτητας σε μικρές ξεχωριστές σταγόνες και παρατηρείται το μήκος του νήματος που σχηματίζεται. Σε δείγματα με φυσιολογικό ιξώδες παρατηρούνται μικρές διακριτές σταγόνες ενώ σε δείγματα με μη φυσιολογικό ιξώδες οι σταγόνες πέφτουν με μορφή νήματος μήκους >2cm.

Τέλος το pH είναι σημαντικό να προσδιορίζεται κατά την πρώτη ώρα της εκσπερμάτισης, ποτέ μετά από μια ώρα γιατί επηρεάζεται από την απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> που λαμβάνει χώρα μετά την εκσπερμάτιση, και πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 7,2. Η τιμή του εξαρτάται από την αναλογία του αλκαλικού εκκρίματος των σπερματοδόχων κύστεων και των όρχεων και των όξινων εκκριμάτων του προστάτη και των επιδιδυμίδων [26],[28].

### 1.3.3 Μικροσκοπική ανάλυση

Όταν ολοκληρωθεί η μακροσκοπική εξέταση ακολουθεί ο προσδιορισμός των παραμέτρων μικροσκοπικά. Η μικροσκοπική ανάλυση του σπέρματος γίνεται σε καθορισμένη ποσότητα δείγματος (10μl) και σε ιδανική θερμοκρασία 37°C, αφού τόσο η κινητικότητα όσο και η ταχύτητα του σπέρματος επηρεάζονται έντονα από την θερμοκρασία. Οι παράμετροι οι οποίοι εξετάζονται είναι οι εξής:

- Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων που εκφράζεται σε εκατομμύρια ανά ml (10<sup>6</sup>/ml δείγματος)

- Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η οποία αξιολογείται σε τρεις βαθμίδες, προωθητική κίνηση (PRM-progressive motility), μη προωθητική κίνηση (NPM-non progressive motility) και σε ακινησία (IM-immotility)
- Ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων ο οποίος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση με τον συνολικό όγκο
- Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων (κεφαλή, αυχέννας, ουρά). Η αξιολόγηση των σπερματοζωαρίων με βάση την μορφή τους περιλαμβάνει την εκατοστιαία αναλογία των φυσιολογικών μορφών σε σχέση με τις ανώμαλες
- Η ζωτικότητα που είναι ιδιαίτερα σημαντική σε δείγματα με μειωμένη κινητικότητα. Η ζωτικότητα αναφέρεται στο % ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων και απαιτείται να ελεγχθεί, στην περίπτωση που η εκατοστιαία αναλογία των ακίνητων σπερματοζωαρίων ξεπερνά το 50% του συνόλου τους.
- Η παρουσία συσσωματωμάτων (προσκολλήσεις σπερματοζωαρίων κινητών ή ακίνητων μεταξύ τους σε βλεννώδεις εκκρίσεις ή βρωμιές)
- Η παρουσία συγκολλήσεων μεταξύ τους (κεφαλή-κεφαλή, ουρά-ουρά ή και κεφαλή-ουρά) που υποδηλώνουν κάποιο ανοσολογικό ή βακτηριακό παράγοντα
- Την ύπαρξη άλλων κυτταρικών στοιχείων όπως για παράδειγμα επιθηλιακών κυττάρων, κυττάρων σπερματογένεσης, λευκοκυττάρων ή ερυθροκυττάρων

### 1.3.4 Εκτίμηση της κινητικότητας

Για την εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων ενός δείγματος, τοποθετείται μια μικρή ποσότητα (10μl) σε αντικειμενοφόρο πλάκα (makler counting chamber) και καλύπτεται στην συνέχεια με συγκεκριμένη καλυπτρίδα. Η καλυπτρίδα αυτή φέρει ένα πλέγμα εμβαδού  $1\text{mm}^2$  υποδιαιρεμένο σε 100 τετράγωνα  $0.1 \times 0.1 \text{ mm}$  το καθένα. Το δείγμα εξετάζεται στη συνέχεια σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης σε μεγέθυνση X250 όπου επισημαίνεται σε διάφορα οπτικά πεδία η συγκέντρωση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων με βάση τις νέες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2010) [26]. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με τη

μέτρηση των σπερματοζωαρίων σε 10 από τα 100 τετράγωνα και εκφράζοντας την τιμή αυτή σε εκατομμύρια/ml. Σε περίπτωση που το δείγμα είναι αρκετά πυκνό και κινητικό συνίσταται να γίνεται μια αραιώση 1:10, αναμειγνύοντας 100μl από το δείγμα και 900μl PBS, να μετριοούνται 10μl από το αραιωμένο δείγμα και την συγκέντρωση που βρίσκουμε την πολλαπλασιάζουμε με το 10 εφόσον το αραιώσαμε 10 φορές.

Κατά την διαδικασία της μέτρησης παρατηρούνται διαφορετικές περιοχές τυχαία επιλεγμένες και γίνεται γρήγορη καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων που βρίσκονται σε μια περιοχή την δεδομένη χρονική στιγμή. Για τον υπολογισμό της κινητικότητας γίνονται δύο μετρήσεις από διαφορετικές σταγόνες και μετρώνται συνολικά 200 σπερματοζωάρια σε τουλάχιστον 5 οπτικά πεδία. Οι δύο μετρήσεις συγκρίνονται μεταξύ τους και υπολογίζεται ο μέσος όρος. Κάθε σπερματοζωάριο που μετράται κατατάσσεται σε μια από τις εξής κατηγορίες:

- ❖ a: ταχεία προωθητική κίνηση
- ❖ b: νωθρή προωθητική κίνηση
- ❖ c: επιτόπια κίνηση
- ❖ d: ακινησία

Με βάση τις νέες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (2010) η κινητικότητα διακρίνεται σε:

- ✓ Πρωωθητική κίνηση (progressive motility, PRM). Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται τα σπερματοζωάρια που κινούνται ενεργά, είτε ευθύγραμμα είτε σε μεγάλους κύκλους, ανεξάρτητα από την ταχύτητα
- ✓ Επιτόπια κίνηση (non-progressive motility, NPM). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει οποιοδήποτε άλλο πρότυπο κίνησης , όπως κίνηση σε μικρούς κύκλους, κίνηση της κεφαλής ή της ουράς χωρίς να κινείται το υπόλοιπο τμήμα
- ✓ Ακινησία (immobility, IM). Απουσία κίνησης

### 1.3.5 Αξιολόγηση του σπερμοδιαγράμματος

Για να μπορέσει να χαρακτηριστεί ένα δείγμα ως φυσιολογικό ή μη φυσιολογικό θα πρέπει οι παράμετροι αυτοί που ελέγχθηκαν να συγκριθούν με τις τιμές αναφοράς (reference values) όπως αυτές έχουν καθοριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO). Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι οι τιμές αναφοράς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος δεν αποτελούν ευρετήριο φυσιολογικών τιμών, αλλά είναι βασισμένες στην κλινική εμπειρία από τη μελέτη υγιών γόνιμων ανδρών. Έτσι ακόμα και οι άνδρες με τιμές παραμέτρων χαμηλότερες από τις τιμές αυτές μπορεί κάλλιστα να είναι γόνιμοι. Στον παρακάτω Πίνακα (4) δίνονται συνοπτικά οι τιμές αυτές.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΚΑΤΩΤΕΡΕΣ ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
Όγκος	1,5 ml
PH	7,2
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων	$15 \times 10^6/\text{ml}$
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	$39 \times 10^6$ / εκσπερμάτιση
Κινητικότητα	32% a+b ή 40% a+b+c
Ζωτικότητα	58% ζωντανά σπερματοζωάρια
Μορφολογία	4% φυσιολογικές μορφές
Λευκά αιμοσφαίρια	$< 1 \times 10^6$ λευκοκύτταρα/ml

Πίνακας 4: Τιμές αναφοράς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος.

Κατά την εκτίμηση του σπερμοδιαγράμματος είναι δυνατόν να βρεθούν διάφορες ανωμαλίες οι οποίες κατατάσσονται ως εξής:

- Ολιγοσπερμία: όπου ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρότερος από 40 εκατομμύρια σε κάθε εκσπερμάτιση, ενώ οι παράμετροι της μορφολογίας και της κινητικότητας είναι ίδιοι με αυτές των φυσιολογικών
- Ασθενοσπερμία: όπου τα  $a+b+c < 40\%$  ή το  $a+b < 32\%$  ενώ ο αριθμός και η μορφολογία αγγίζουν τα φυσιολογικά δεδομένα
- Τερατοζωοσπερμία: όταν η μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι  $< 30\%$
- Αζωοσπερμία: ανυπαρξία σπερματοζωαρίων στο πλάσμα ή ακόμα και στο ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση
- Ασπερμία: παντελής έλλειψη σπερματικού πλάσματος
- Κρυπτοζωοσπερμία: όταν σπερματοζωάρια δεν υπάρχουν σε φρέσκο δείγμα αλλά ανευρίσκονται μετά από φυγοκέντρηση
- Νεκροζωοσπερμία: χαμηλό ποσοστό ζωντανών και υψηλό ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων
- Νορμοζωοσπερμία: όταν ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ή η συγκέντρωση, το ποσοστό των προωθητικώς κινούμενων και μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι χαμηλότερα των τιμών αναφοράς
- Αιμοσπερμία: παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων
- Λευκοσπερμία: παρουσία  $> 10^6$  λευκών αιμοσφαιρίων/ml
- Πιθανοί συνδυασμοί των παραπάνω παθολογικών καταστάσεων είναι η ολιγοασθενοσπερμία ή ολιγοασθενοτερατοσπερμία (ΟΤΑ)

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή με σημαντικές ιατρικές και οικονομικές πτυχές και επηρεάζει το 15% των ζευγαριών. Αν και είναι υπεύθυνα διάφορα αίτια για την στειρότητα όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μελέτες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους έδειξαν ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης εμπλέκεται τόσο στην ανδρική όσο και στην γυναικεία στειρότητα. Οι πληροφορίες που παρουσιάστηκαν στην ενότητα της εισαγωγής καθιστούν σαφέστατο το γεγονός ότι η βιταμίνη D είναι μια ορμόνη που σχετίζεται με την ανδρική αναπαραγωγή, καθώς διάφορες μελέτες απέδειξαν ότι ο υποδοχέας της βιταμίνης και τα ένζυμα που την μεταβολίζουν εκφράζονται στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια.

Αυτά όλα τα ευρήματα καθώς και η σχετική έλλειψη σχεδιασμένων μελετών *in vitro* για την επίδραση της έκθεσης του σπέρματος στην βιταμίνη D μας οδήγησαν στο να σχεδιάσουμε την παρούσα μελέτη. Στόχος μας τέθηκε η καταγραφή της κινητικότητας του σπέρματος μετά την έκθεση του σε διάφορες συγκεντρώσεις του ενεργού μεταβολίτη της βιταμίνης D {1,25- διυδροξυβιταμίνης D (1,25(OH)<sub>2</sub> D}. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 18 δείγματα σπέρματος από υπογόνιμα ζευγάρια που είχαν καταφύγει στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΜΥΑ) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας και μελετήθηκαν ως προς τις αλλαγές που υπέστησαν μετά την έκθεση τους στην βιταμίνη.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας όπου συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν 18 δείγματα σπέρματος από άνδρες που συμμετείχαν σε κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή εξετάστηκαν με σπερμοδιάγραμμα για την ποιότητα του σπέρματος.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή ο τρόπος λήψης σπέρματος είναι ιδιαίτερα σημαντικός για να μπορεί στην συνέχεια να αξιολογηθεί σωστά, χωρίς να υπάρχουν απώλειες ή επιμολύνσεις που να επηρεάσουν τις μετρήσεις. Για το λόγο αυτό η συλλογή αυτών των δειγμάτων πραγματοποιείται σε ειδικό χώρο της μονάδας, κοντά στο εργαστήριο. Οι εξεταζόμενοι συλλέγουν το δείγμα με αυνανισμό σε δοχείο-συλλέκτη (urobox), στο οποίο αναγράφουν τα στοιχεία τους όπως το ονοματεπώνυμο τους και την ώρα παραγωγής του δείγματος. Στη συνέχεια το κάθε δείγμα που λαμβάνεται παραμένει στην hood για περίπου 15-30 λεπτά μέχρι να ρευστοποιηθεί.

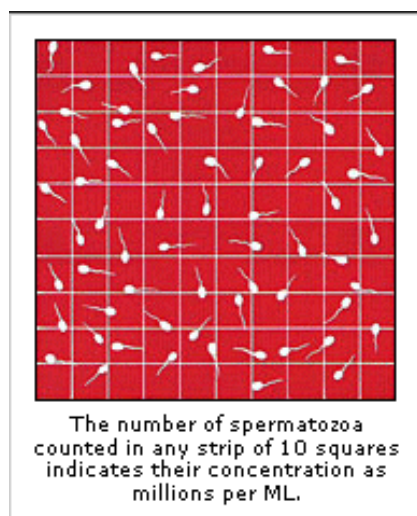
Εφόσον ρευστοποιηθεί το δείγμα υπολογίζεται και καταγράφεται αρχικά ο όγκος του και έπειτα ακολουθεί η μικροσκοπική ανάλυσή του (συγκέντρωση, κινητικότητα). Για το λόγο αυτό τοποθετούνται 10μl αδιάλυτου δείγματος σε Makler counting chamber (Εικόνα 5) και παρατηρείται το δείγμα σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης με μεγέθυνση x10 στους προσοφθάλμιους φακούς και x25 στους αντικειμενοφόρους φακούς.



Εικόνα 5: Η αντικειμενοφόρος πλάκα Makler counting chamber



Στο οπτικό πεδίο παρατηρείται ένα πλέγμα με 100 τετράγωνα και ο καθορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων γίνεται με την μέτρηση 10 τετραγώνων οριζόντια ή κάθετα και αναγωγή της τιμής που μετρήθηκε σε εκατομμύρια ανά ml (Εικόνα 6). Υπολογίζεται και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε ποσοστά ελέγχοντας 5 διαφορετικά πεδία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται και μια δεύτερη μέτρηση και υπολογίζεται ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.



Εικόνα 6: Το οπτικό πεδίο που παρατηρείται στο μικροσκόπιο

## 2.1 Προετοιμασία της βιταμίνης

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα δείγματα επωάστηκαν με τον ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D δηλαδή την 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3 {1,25(OH)<sub>2</sub>D} της εταιρείας Sigma-Aldrich (CatNr.: D1530). Με βάση τις βιβλιογραφίες αναφορές επιλέξαμε να μελετήσουμε την επίδραση της βιταμίνης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε δύο συγκεντρώσεις οι οποίες είναι η 0,01nM και η 0,1nM. Για το σκοπό αυτό, η βιταμίνη που βρίσκεται σε μορφή σκόνης διαλύθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας σε καθαρή αιθανόλη σε διάλυμα stock με συγκέντρωση 24  $\mu$ M ώστε να έχει τις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

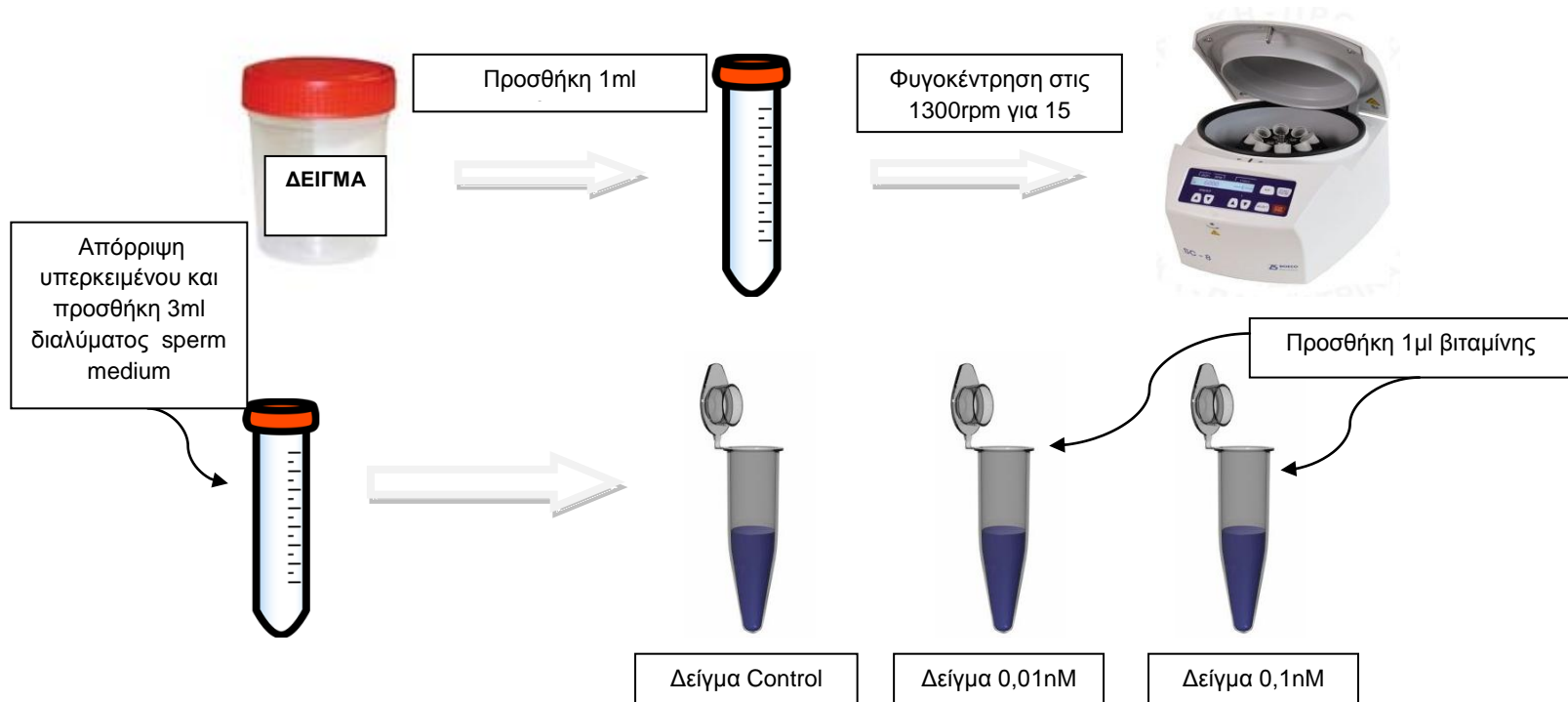
Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε 1μl του κλάσματος από τα erpendorfs με καθεμία από τις δύο τελικές συγκεντρώσεις και τις αραιώσαμε σε διάλυμα (sperm medium) τελικού όγκου 1000μl (1ml).

Αντιδραστήριο	Cat. Nr.	Προέλευση
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D</b>	D1530	Sigma Aldrich
<b>Ethanol absolute</b>	24194-2.5L-R	Sigma Aldrich

Πίνακας 5 : Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της βιταμίνης

## 2.2 Προετοιμασία των δειγμάτων

Μετά την αρχική εκτίμηση του δείγματος ως προς την συγκέντρωση και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, τοποθετήθηκε 1ml από το δείγμα σε falcon (15 ml) και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1300rpm για 15 λεπτά ώστε να μετακινηθούν όλα τα σπερματοζωάρια στο ίζημα και το σπερματικό πλάσμα στο υπερκείμενο. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο όπου περιείχε το σπερματικό πλάσμα χωρίς να αναταραχθεί το ίζημα και προστέθηκαν σε αυτό 3ml από το sperm medium και ακολούθησε ήπια ανάδευση με τη πιπέτα μέχρι το μίγμα να γίνει ομοιογενές. Όταν το μίγμα ομογενοποιηθεί και δεν υπάρχουν κομμάτια από το ίζημα, προετοιμάζουμε τρία erpendorf, ένα για το δείγμα ελέγχου (control) και τα δύο άλλα για τις συγκεντρώσεις 0,01nM και 0,1nM που θέλουμε να μελετήσουμε. Τοποθετούμε σε καθένα από αυτά 1ml από το ομογενοποιημένο δείγμα και στα δύο erpendorf (εκτός του control) τοποθετείται και 1μl από την βιταμίνη.



Κατά τρόπο ανάλογο με το αρχικό δείγμα τοποθετούνται 10μl στην αντικειμενοφόρο πλάκα από τα τρία δείγματα (control, 0.01nM, 0.1nM) ξεχωριστά για την μέτρηση της κινητικότητας στο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Πριν από την τοποθέτηση του δείγματος προηγείται ήπια ανάδευση των τριών δειγμάτων για να υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή των σπερματοζωαρίων στο υγρό και η ποσότητα που θα αναρροφάται με την πιπέτα να είναι αντιπροσωπευτική του συνόλου. Οι μετρήσεις για τον υπολογισμό της κινητικότητας τόσο στο δείγμα ελέγχου (control) όσο και στα δείγματα με τη βιταμίνη πραγματοποιήθηκαν μετά από το πέρας 30min, 60min, 180min και 24hr.

Για την στατιστική ανάλυση και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα IBM SPSS (paired t-test), Microsoft Office Excel 2007 και Microsoft Word 2007.



Εικόνα 7: Μέτρηση της κινητικότητας του σπέρματος μετά το πέρας από 30min, 60min, 180min και 24hr επώασης με την βιταμίνη

## 2.3 Υλικά- Διαλύματα

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3 {1,25(OH)<sub>2</sub>D} (Sigma-Aldrich)
- Ethanol absolute (Sigma-Aldrich)
- Sperm medium

### ΟΡΓΑΝΑ

- Μικροσκόπιο αντίθετης φάσης
- Makler counting chamber
- Πιπέτα 0,1-10 μl
- Πιπέτα 100-1000μl
- Φυγόκεντρος

- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Καλυπτρίδες 22x22mm

## ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Δοχεία-συλλέκτες (ourobbox)
- Biosphere filter tips 0,1-10μl
- Biosphere filter tips 50-1000μl
- Eppendorf tubes
- 15 ml Polystyrene Conical Tubes (Falcon)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ

Ο αριθμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την επίδραση της βιταμίνης D στην κινητικότητα του σπέρματος και συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση είναι 18. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται τα δημογραφικά στοιχεία των εξεταζόμενων τα οποία μας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα των δειγμάτων.

Στοιχεία Δειγμάτων	N	MEAN ± Std Deviation
Ηλικία (έτη)	18	36,8 ± 5,8
BMI	9	29,6±6,2
Όγκος σπέρματος (ml)	18	2,9 ± 0,9
Συγκέντρωση σπέρματος (εκατ./ml)	17	76,2 ± 53,7
Κατανάλωση Αλκοόλ (Ποσοστό %)	14	ΝΑΙ 35,70 ΟΧΙ 64,30
Κάπνισμα (Ποσοστό %)	14	ΝΑΙ 35,70 ΟΧΙ 64,30

Πίνακας 6: Πληροφοριακός πίνακας που περιέχει τα δημογραφικά στοιχεία των δειγμάτων που μελετήθηκαν

### 3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ Η' ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ

Τα δείγματα μετά την ρευστοποίησή τους, δηλαδή μετά το χρονικό διάστημα των 20-30 λεπτών και την κατάλληλη επεξεργασίας τους, εκτέθηκαν στις δύο συγκεντρώσεις της βιταμίνης D (0.01nM,0.1nM) εκτός από το δείγμα ελέγχου (control) στο οποίο προστέθηκε μόνο αιθανόλη στην αντίστοιχη ποσότητα με την βιταμίνη για να έχουμε τον ίδιο τελικό όγκο. Στους παρακάτω Πίνακες παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα στα οποία προστέθηκε η βιταμίνη στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις και εξετάζονται ως προς την προωθητική κίνηση (PRM) και την ακινησία (IM) στους εξής χρόνους έκθεσης της βιταμίνης 30min,60min,180min και 24hr.

Επίδραση της βιταμίνης D στα 30min			
Κινητικότητα	Δείγματα		
	Control	0,01nM	0,1nM
Πρωθητική κίνηση (PRM)	45±20,89	51,29±18,04	51,21±21,42
Ακινησία (IM)	40,07±19,79	33,57±15,93	34,28±20,39

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας των μέσων όρων της κινητικότητας και της ακινησίας των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων μετά την προσθήκη της βιταμίνης στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις στο χρονικό διάστημα των 30min

Επίδραση της βιταμίνης D στα 60min			
Κινητικότητα	Δείγματα		
	Control	0,01nM	0,1nM
Πρωθητική κίνηση (PRM)	46,37±20,32	48,31±19,98	52,06±21,70
Ακίνησια (IM)	37,31±18,74	34,12±18,66	32,06±19,28

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας των μέσων όρων της κινητικότητας και της ακινησίας των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων μετά την προσθήκη της βιταμίνης στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις στο χρονικό διάστημα των 60min

Επίδραση της βιταμίνης D στα 180min			
Κινητικότητα	Δείγματα		
	control	0,01nM	0,1nM
Πρωθητική κίνηση (PRM)	44,83±19,37	42,94±19,49	42,28±19,88
Ακίνησια (IM)	36,5±17,02	37,44±18,07	37,39±18,37

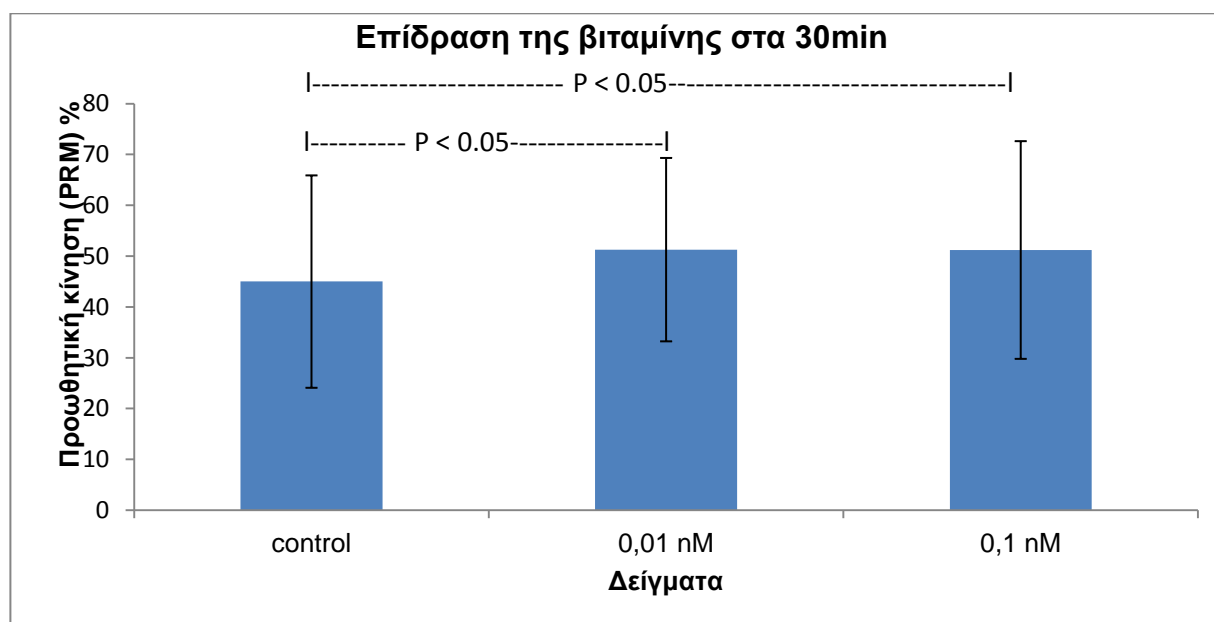
Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας των μέσων όρων της κινητικότητας και της ακινησίας των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων μετά την προσθήκη της βιταμίνης στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις στο χρονικό διάστημα των 180min



Επίδραση της βιταμίνης D στις 24hr			
Κινητικότητα	Δείγματα		
	Control	0,01nM	0,1nM
Πρωθητική κίνηση (PRM)	31,56±17,31	29,72±19,82	32,22±17,18
Ακινήσια (IM)	50,33±18,31	53,17±21,42	49,05±19,29

Πίνακας 10: Συγκεντρωτικός πίνακας των μέσων όρων της κινητικότητας και της ακινήσιας των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων μετά την προσθήκη της βιταμίνης στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις στο χρονικό διάστημα των 24hr

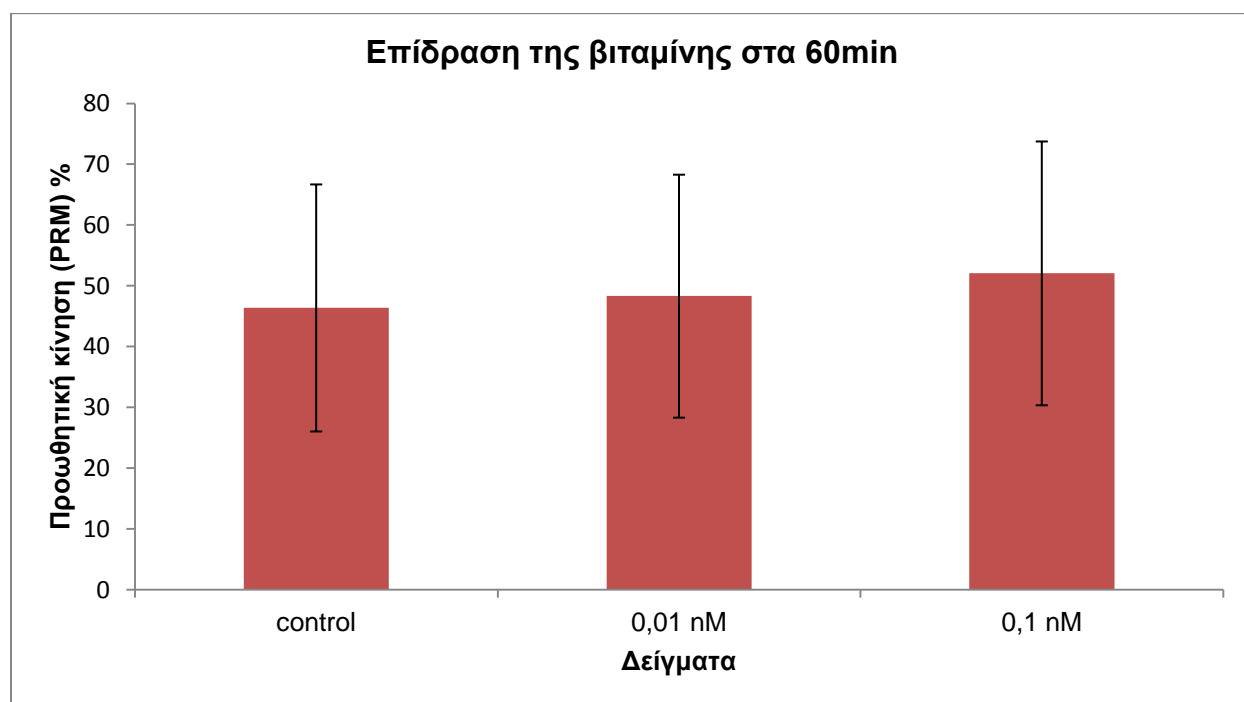
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μεταβολές της πρωθητικής κίνηση (PRM) του δείγματος ελέγχου (control) σε σχέση με τα δείγματα στα οποία προστέθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.01nM και 0.1nM της βιταμίνης.



Διάγραμμα 1: Μεταβολή της πρωθητικής κίνησης (PRM) στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα με την βιταμίνη D στα 30min

Από την εφαρμογή του t-test στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS και συγκρίνοντας τις τιμές της προωθητικής κίνησης (PRM) μεταξύ του δείγματος ελέγχου (control) και του δείγματος με την συγκέντρωση της βιταμίνης D στα 0.01nM στο χρονικό διάστημα των 30min προκύπτει ότι το  $P \text{ value} < 0.05$ . Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ένδειξη ότι η διαφορά μεταξύ του δείγματος ελέγχου και του δείγματος με την 0.01nM συγκέντρωση της βιταμίνης ως προς την προωθητική κίνηση είναι Στατιστικά Σημαντική. Ακόμη συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ του δείγματος ελέγχου και του δείγματος με τη συγκέντρωση της βιταμίνης D στα 0,1nM προκύπτει ότι το  $P \text{ value} < 0.05$  και συνεπώς και από εδώ προκύπτει αντίστοιχα ότι η διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων είναι στατιστικά σημαντική.

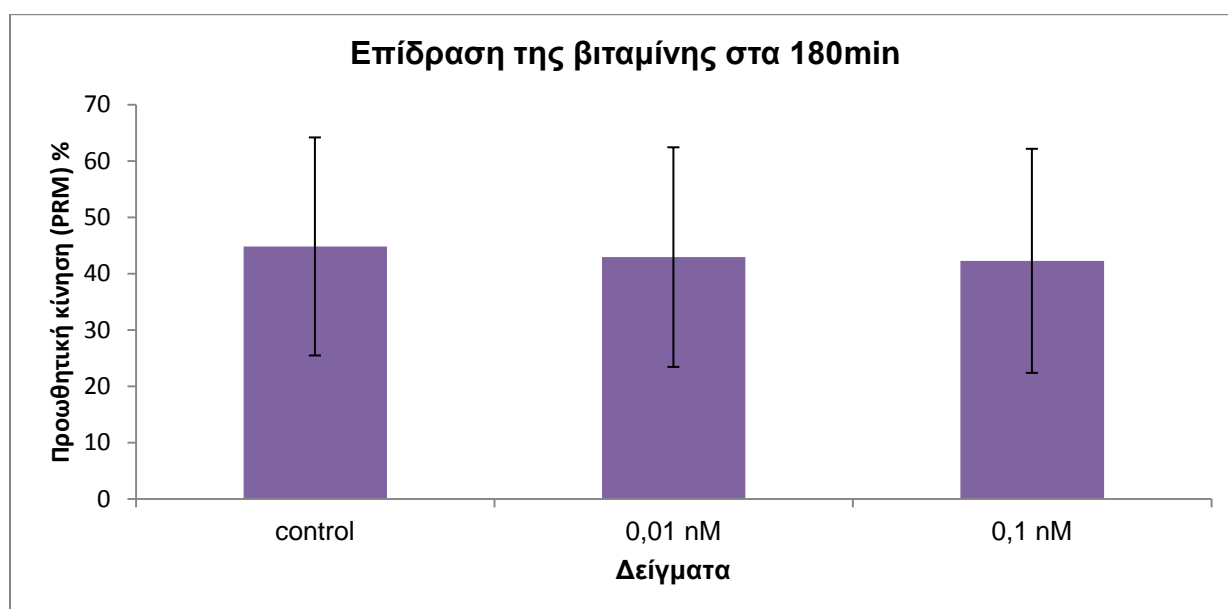
- **Προωθητική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.01  $P \text{ value} < 0.05$  significant**
- **Προωθητική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.1  $P \text{ value} < 0.05$  significant**



Διάγραμμα 2: Μεταβολή της προωθητικής κίνησης (PRM) στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα με την βιταμίνη D στα 60min

Από την εφαρμογή του t-test στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS και συγκρίνοντας τις τιμές της προωθητικής κίνησης (PRM) μεταξύ του δείγματος ελέγχου (control) και των δειγμάτων με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης D (0.01nM,0.1nM) στο χρονικό διάστημα των 60min προκύπτει ότι δεν υπάρχει Στατιστικά Σημαντική διαφορά μεταξύ όλων των δειγμάτων.

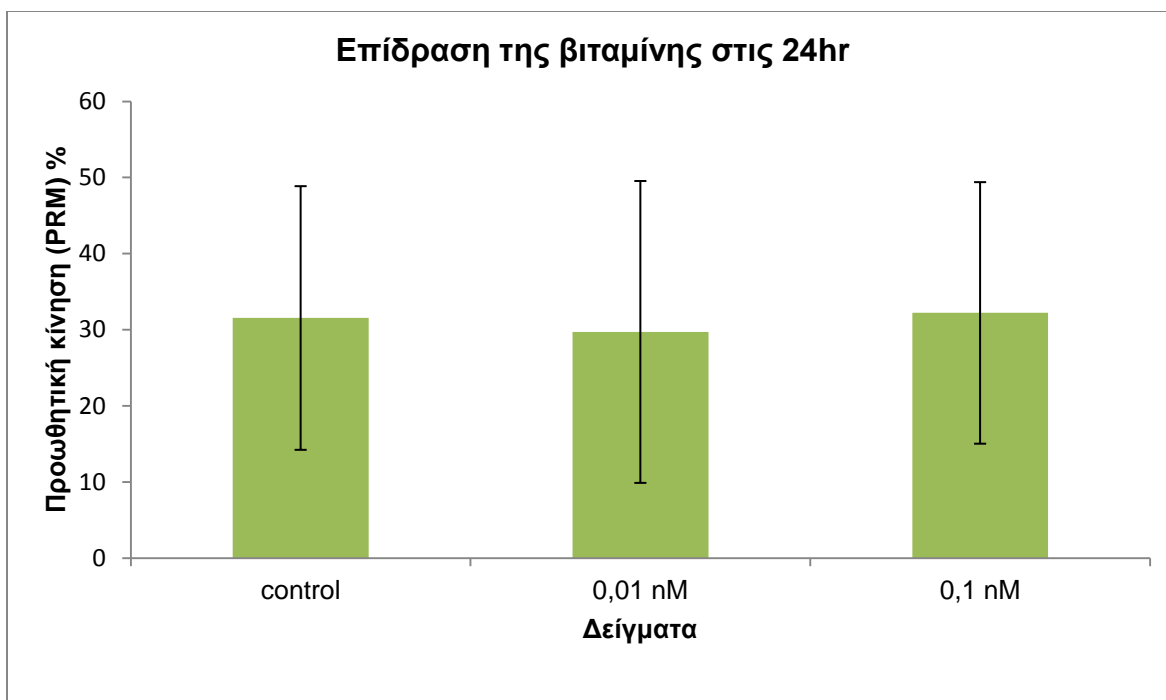
- **Πρωθητική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.01 P value>0.05 no significant**
- **Πρωθητική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.1 P value>0.05 no significant**



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της προωθητικής κίνησης (PRM) στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα με την βιταμίνη D στα 180min

Σε αυτή την περίπτωση συγκρίνοντας τις τιμές της προωθητικής κίνησης (PRM) μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις 0.01nM και 0.1nM της βιταμίνης D μετά το πέρας των 180min προκύπτει ότι δεν υπάρχει Στατιστικά Σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.

- **Πρωθητική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.01 P value>0.05 no significant**
- **Πρωθητική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.1 P value>0.05 no significant**

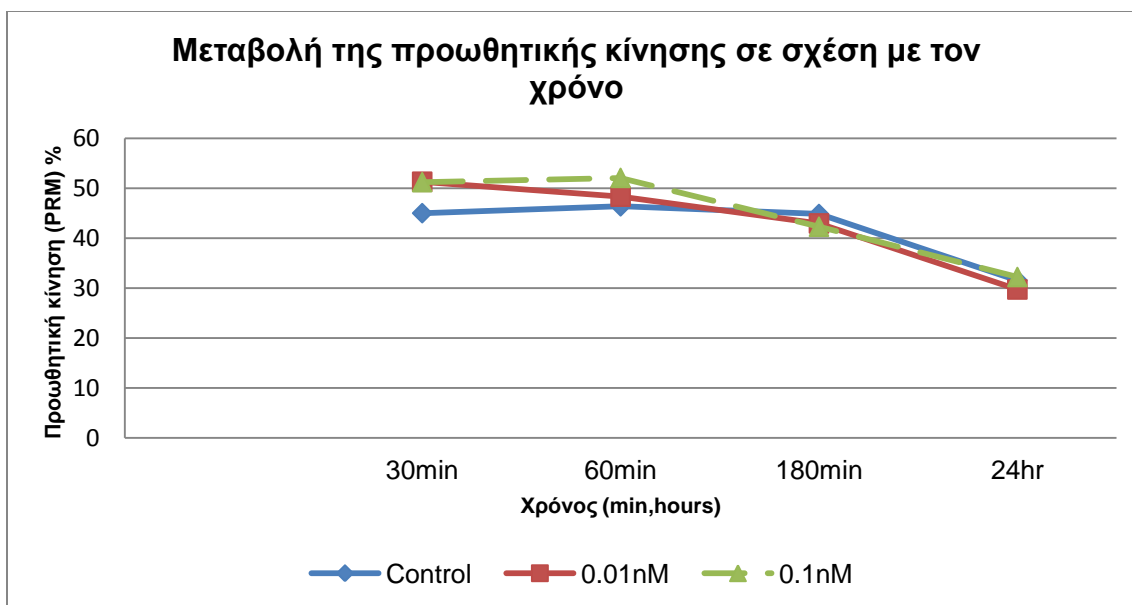


Διάγραμμα 4: Μεταβολή της πρωθρομβτικής κίνησης (PRM) στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα με την βιταμίνη D στις 24hr

Και σε αυτή την περίπτωση συγκρίνοντας τις τιμές της πρωθρομβτικής κίνησης (PRM) μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις 0.01nM και 0.1nM της βιταμίνης D μετά το πέρας των 24 ωρών προκύπτει ότι δεν υπάρχει Στατιστικά Σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.

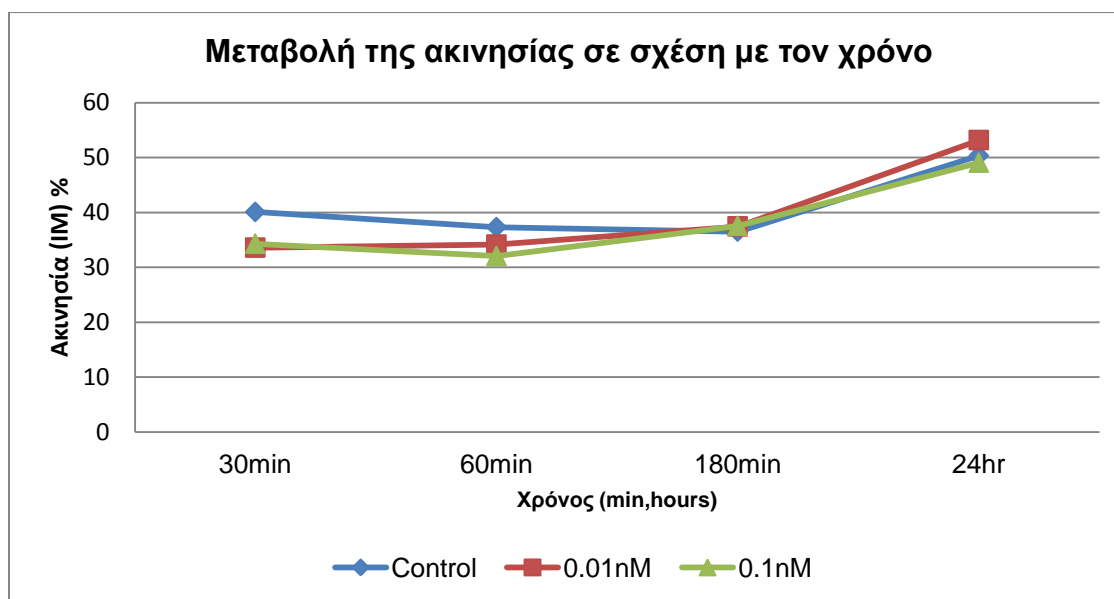
- **Πρωθρομβτική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.01 P value>0.05 no significant**
- **Πρωθρομβτική κίνηση (PRM) Control Vs Vitamin 0.1 P value>0.05 no significant**

Το διάγραμμα 5 που παρουσιάζεται παρακάτω, αναπαριστά την μεταβολή του ποσοστού της πρωθρομβτικής κίνησης (PRM) των δειγμάτων με ή χωρίς την προσθήκης της βιταμίνης σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα στα οποία εκτέθηκαν τα δείγματα στην βιταμίνη.



Διάγραμμα 5: Μεταβολή της προωθητικής κίνησης στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα με την βιταμίνη σε σχέση με τον χρόνο

Αντίστοιχα και στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού της ακινησίας (IM) του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων στα οποία προστέθηκε η βιταμίνη στις δύο συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή της ακινησίας στο δείγμα ελέγχου και στα δείγματα με την βιταμίνη σε σχέση με τον χρόνο

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην σημερινή εποχή πολλά ζευγάρια αντιμετωπίζουν την αδυναμία να τεκνοποιήσουν και αυτό το γεγονός οφείλεται σε ένα σημαντικό βαθμό και στον ανδρικό παράγοντα. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή και για την εκδήλωσή της οφείλονται διάφορα αίτια. Για το λόγο αυτό θα πρέπει η αξιολόγηση του άντρα να πραγματοποιείται στον ίδιο βαθμό που αντιμετωπίζεται και η γυναίκα. Τα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της υπογονιμότητας συνήθως καταφεύγουν στις τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια θεραπευτική μέθοδος σε σχέση με τον άνδρα που να μπορεί να βελτιώσει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως για παράδειγμα την κινητικότητα, και να προσδιορίσει κατά πόσο η διαδικασία της θεραπείας σε ένα υπογόνιμο ζευγάρι μπορεί να επωφεληθεί από την χρήση τέτοιων μεθόδων.

Η βιταμίνη D είναι ένα ευέλικτο μόριο σηματοδότησης με καλά εδραιωμένο ρόλο και με σημαντικές ιδιότητες, μερικές από τις οποίες είναι η ρύθμιση της απορρόφησης του ασβεστίου και του φωσφόρου, η σωστή ανάπτυξη των οστών, η αντίσταση σε ασθένειες. Ο κύριος τρόπος σύνθεσής της είναι από τον οργανισμό, κυρίως μέσω της απορρόφησης της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας από το δέρμα. Η ορμόνη αυτή μεταβολίζεται στο ήπαρ και στη συνέχεια στο νεφρό για να σχηματιστεί η δραστική της μορφή που είναι η 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3 {1,25(OH)2D}. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D δηλαδή η 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3 {1,25(OH)2D} είναι ένας παράγοντας που σχετίζεται με το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα καθώς ο υποδοχέας της βιταμίνης όπως και τα ένζυμα που την μεταβολίζουν, βρέθηκε να εκφράζονται στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Η ανακάλυψη αυτήν ώθησε τους ερευνητές να πραγματοποιήσουν περαιτέρω έρευνες για να διαπιστώσουν τον ακριβή ρόλο αυτού του μορίου στην φυσιολογία της αναπαραγωγής.

Οι διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια εξέταζαν κυρίως την σχέση μεταξύ της ποσότητας της βιταμίνης D στον ορό με τις διάφορες παραμέτρους του σπέρματος δηλαδή την κινητικότητα, τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και την

μορφολογία τους. Δανοί ερευνητές μάλιστα σε *in vivo* πειράματα που πραγματοποίησαν, διαπίστωσαν ότι οι άνδρες με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό έχουν χαμηλής ποιότητας σπερματοζωάρια. Σε μια ακόμη έρευνα που πραγματοποιήθηκε, αξιολογήθηκε η ανατομία του ανθρώπινου σπέρματος, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αμινοξέων του ανθρώπινου υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και παρατηρήθηκε ότι η περιοχή εντόπισής του βρίσκεται στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων, αν και μερικά σωματίδια εντοπίστηκαν ομοιόμορφα και στον αυχένα αυτών. Η καταλυτική σύνδεση της ορμόνης στον υποδοχέα (VDR) αυξάνει τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, τα οποία ακολούθως επηρεάζουν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και την ενεργοποίησή τους με σκοπό να ακολουθήσει στη συνέχεια η ακροσωμική αντίδραση, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητα γονιμοποίησης του ωαρίου. Τα δεδομένα από όλες αυτές τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί υποδεικνύουν ότι η βιταμίνη D ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων την επιβίωσή τους και την επακόλουθη ακροσωμική αντίδραση.

Η σχετική έλλειψη σχεδιασμένων μελετών *in vitro* για την διερεύνηση της επίδρασης της βιταμίνης D στην κινητικότητα του σπέρματος τόσο των γόνιμων όσο και των υπογόνιμων ανδρών μας οδήγησε στο σχεδιασμό της παρούσας μελέτης. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 18 δείγματα σπέρματος μεταξύ της περιόδου Μαΐου και Ιουνίου από υπογόνιμα ζευγάρια που είχαν καταφύγει στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΜΥΑ) και μελετήθηκαν ως προς τις αλλαγές που υπέστησαν στην κινητικότητα μετά την έκθεση τους σε διάφορες συγκεντρώσεις της 1,25-διϋδροξυβιταμίνης D<sub>3</sub> {1,25(OH)<sub>2</sub>D}.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση του ενεργού μεταβολίτη της βιταμίνης D σε δύο συγκεντρώσεις, την 0,01nM και την 0,1nM οι οποίες προστέθηκαν στα δείγματα σπέρματος, αφού βέβαια πρώτα είχαν υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία. Για κάθε δείγμα στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 4 μετρήσεις κινητικότητας. Η πρώτη μέτρηση αφορούσε το νωπό δείγμα και οι 3 άλλες μετρήσεις αφορούσαν το δείγμα control (δηλαδή το δείγμα χωρίς καμία προσθήκη κάποια συγκέντρωσης της βιταμίνης) και τα δύο δείγματα μετά την προσθήκη των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων της βιταμίνης, στα εξής χρονικά διαστήματα 30min, 60min, 180min και 24hr.

Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων μας συμπεραίνουμε πως η μέγιστη δράση της βιταμίνης D εμφανίζεται στο διάστημα των 30min και από την στατιστική ανάλυση φαίνεται να είναι αποτελεσματικές και οι δύο συγκεντρώσεις της βιταμίνης δηλαδή η 0.01nM και η 0.1nM. Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα 1 το οποίο αφορά την προωθητική κίνηση των σπερματοζωαρίων (PRM), παρατηρείται ότι τα δείγματα με τις δύο συγκεντρώσεις της βιταμίνης έχουν τα υψηλότερα ποσοστά κινητικότητας σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Η μέγιστη αυτή δράση της βιταμίνης παρατηρείται κυρίως στα 30min και το γεγονός αυτό διαπιστώνεται παρατηρώντας και τα επόμενα διάγραμμα όπου γίνεται φανερό ότι δεν αυξάνεται η προωθητική κίνηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control). Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και δύο άλλες μελέτες των Saveria Aquila (2009) και Martin Blomberg Jensen (2011), οι οποίοι μελέτησαν τις ίδιες συγκεντρώσεις της βιταμίνης και παρατήρησαν πως η χαμηλή δόση της βιταμίνης προκαλεί την πλειονότητα των δραστηριοτήτων του σπέρματος και εντός των 45min, ενώ οι υψηλότερες δόσεις της ορμόνης και μετά την έκθεση σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα των 45min είναι αναποτελεσματικές. Βασισμένοι σε αυτές τις δύο αναδρομικές μελέτες και χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα της βιταμίνης D, έγινε αντιληπτό και στην δική μας μελέτη ότι οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης έχουν διαφορετική επίδραση στην κινητικότητα του σπέρματος. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και στο διάστημα των 30 λεπτών λειτουργεί θετικά, καταλαμβάνοντας τους υποδοχείς που βρίσκονται στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων και επηρεάζοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια του ασβεστίου και κατ' επέκταση την λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Με την παραμονή της ορμόνης για περισσότερο χρονικό διάστημα στα δείγματα ίσως να καταλαμβάνονται όλοι οι υποδοχείς (κορεσμένοι υποδοχείς) και γι' αυτό η παραπάνω έκθεση στην ορμόνη να είναι αναποτελεσματική.

Τα ευρήματα από τις μέχρι τώρα έρευνες καθώς και της δικής μας μελέτης είναι ιδιαίτερα σημαντικά, αν σκεφτεί κανείς ότι προσθέτοντας αυτή την μικρή δόση της βιταμίνης D μπορεί να αυξηθεί η κινητικότητα του σπέρματος και μπορεί η ορμόνη αυτή να προστεθεί σε δείγματα τα οποία προορίζονται για ενδομήτριες σπερματεγχύσεις (IUI). Συνδυασμένα όλα αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η 1,25-διϋδροξυβιταμίνη



D3 {1,25(OH)<sub>2</sub>D} μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος σε τουλάχιστον μερικές περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας με ασφαλές και μη επεμβατικό τρόπο. Παρόλα αυτά θα πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν είναι μικρός και επομένως καθίσταται σημαντική η εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων έτσι ώστε να ισχυροποιηθεί το συμπέρασμα αυτό.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, A. Giwercman, Z. Kopa, C. Krausz, H. Tournaye. Guidelines on Male Infertility. s.l.: European Association on Urology, 2015
2. Aquila, S. et al. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. *J. Anat.* 213, 555–564 (2008).
3. Aquila S, Guido C, Middea E, Perrotta I, Bruno R, Pellegrino M, Ando S. Human male gamete endocrinology:  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism, *Reprod Biol Endocrinol* , (2009).
4. Bedu-Addo K, Costello S, Harper C, hado-Oliveira G, Lefievre L, Ford C, Barratt C, Publicover S. Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm—a mechanism for regulation of flagellar activity, *Int J Dev Biol* , (2008)
5. Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jorgensen A, Rajpert-de Meyts E, Kristensen DM, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Juul A, Leffers H. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract, *Hum Reprod* , (2010).
6. Blomberg Jensen, M. et al. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 26, 1307–1317 (2011).
7. Blomberg Jensen M. Vitamin D and male reproduction. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. 10(3): 175-186.
8. Boisen IM, Bøllehuus Hansen L, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. Possible influence of vitamin D on male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016. pii: S0960-0760(16)30259-X.
9. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*, 2008. 29(6): 726-776.

10. DS, Irvine. Epidemiology and aetiology of male Infertility. Human Reproduction. 1998.
11. Fleet JC. Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention, Mol Aspects Med, 2008, vol. 29 (pg. 388-396)
12. Hammoud, et al., Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters, Asian J. Androl. 14 (2012) 855–859.
13. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system, Nature , 1997vol. 390(pg. 509-512)
14. Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 restores fertility of vitamin D-deficient female rats. Am J Physiol 1989, 256:483-487.
15. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads, Endocrinology , 2000, vol. 141 (pg. 1317-1324)
16. K. S. Raja Kumari\*, Nandini M. Hadalagi. Role of sunshine vitamin “D” sufficiency in male and female infertility. 2015
17. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. Br J Nurs, 2016.
18. Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. Mol Cancer Ther. 2006;5:797–808
19. Menegaz D, Rosso A, Royer C, Leite LD, Santos AR, Silva FR. Role of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$  vitamin D3 on alpha-[1-(14)C]MeAIB accumulation in immature rat testis, Steroids, 2009, vol. 74 (pg. 264-269)
20. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. Nat Rev Drug Discov 3, 27–41
21. N. Rojansky, A. Brzezinski, J.G. Schenker, Seasonality in human reproduction: an update, Hum. Reprod. 7 (1992) 135–745
22. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D, Trends Biochem Sci , 2004, vol. 29 (pg. 664-673)
23. Uhland, A.M., Kwiecinski, G. G., & DeLuca, H. F. Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats. J. Nutr.122, 1338-1344 (1992).

24. Yang, B. et al. Associations between testosterone, bone mineral density, vitamin D and semen quality in fertile and infertile Chinese men. *Int. J. Androl.* 35, 783–792 (2012).
25. Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms, *Cell Mol Life Sci*, 2008, vol. 65 (pg. 3446-3457)
26. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (5<sup>th</sup> edition), 2010
27. WHO manual for the investigation and diagnosis of the infertile couple, 1985
28. Ελληνική Ανδρολογική Εταιρεία, Ενδοκρινολογία Αναπαραγωγής στη γυναίκα και τον άνδρα, Ι. Παπαδήμας - Δ. Πανίδης, Θεσσαλονίκη, 2004, Εκδόσεις Γράμμα.

## ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ

- A. [https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B9%CF%84%CE%B1%CE%BC%CE%AF%CE%BD%CE%B7#.CE.92.CE.B9.CF.84.CE.B1.CE.BC.CE.AF.CE.BD.CE.B7\\_D](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B9%CF%84%CE%B1%CE%BC%CE%AF%CE%BD%CE%B7#.CE.92.CE.B9.CF.84.CE.B1.CE.BC.CE.AF.CE.BD.CE.B7_D)
- B. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/165748.php>

## ΕΙΚΟΝΕΣ

1. [https://www.google.gr/search?q=cut+of+reference+values+of+sperm+characteristics&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi\\_I5jAuLPWAhXEwxQKHd3uDSIQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgsrc=jGw\\_O7EX2FHbEM:](https://www.google.gr/search?q=cut+of+reference+values+of+sperm+characteristics&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi_I5jAuLPWAhXEwxQKHd3uDSIQ_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgsrc=jGw_O7EX2FHbEM:)
2. [https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_D](https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_D)
3. Vitamin D and male reproduction (PDF Download Available). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/259720551\\_Vitamin\\_D\\_and\\_male\\_reproduction](https://www.researchgate.net/publication/259720551_Vitamin_D_and_male_reproduction) [accessed Sep 20, 2017]
4. Vitamin D and male reproduction (PDF Download Available). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/259720551\\_Vitamin\\_D\\_and\\_male\\_reproduction](https://www.researchgate.net/publication/259720551_Vitamin_D_and_male_reproduction) [accessed Sep 20, 2017]

5. Vitamin D and male reproduction (PDF Download Available). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/259720551\\_Vitamin\\_D\\_and\\_male\\_reproduction](https://www.researchgate.net/publication/259720551_Vitamin_D_and_male_reproduction) [accessed Sep 20, 2017]
6. I.M. Boisen, et al., Possible influence of vitamin D on male reproduction, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. (2016)
7. I.M. Boisen, et al., Possible influence of vitamin D on male reproduction, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. (2016)
8. [https://www.google.gr/search?q=makler+counting+chamber&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj17K2Gv7bWAhVL2xoKHTPHClkQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgsrc=XtPYI9gx6lu1mM:](https://www.google.gr/search?q=makler+counting+chamber&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj17K2Gv7bWAhVL2xoKHTPHClkQ_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgsrc=XtPYI9gx6lu1mM:)
9. [https://www.google.gr/search?biw=1366&bih=638&tbm=isch&sa=1&q=mikroskopio+antitheths+fashs&oq=mikroskopio+antitheths+fashs&gs\\_l=psy-ab.3...38687.41902.0.42146.17.15.0.0.0.0.299.2411.0j6j6.12.0....0...1.1.64.psy-ab..5.1.297...0i30k1j0i24k1.0.kR32oMme28s#imgsrc=GRxoyOusApKZ6M:](https://www.google.gr/search?biw=1366&bih=638&tbm=isch&sa=1&q=mikroskopio+antitheths+fashs&oq=mikroskopio+antitheths+fashs&gs_l=psy-ab.3...38687.41902.0.42146.17.15.0.0.0.0.299.2411.0j6j6.12.0....0...1.1.64.psy-ab..5.1.297...0i30k1j0i24k1.0.kR32oMme28s#imgsrc=GRxoyOusApKZ6M:)